



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/40221</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. August 1999 (12.08.99)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 55%; vertical-align: top;"><p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00716</p><p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)</p><p>(30) Prioritätsdaten: 198 04 372.4 4. Februar 1998 (04.02.98) DE</p><p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).</p><p>(72) Erfinder; und</p><p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).</p><p>(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).</p></td><td style="width: 45%; vertical-align: top;"><p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p><p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p></td></tr></table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00716</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 04 372.4 4. Februar 1998 (04.02.98) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).</p> <p>(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00716</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 04 372.4 4. Februar 1998 (04.02.98) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).</p> <p>(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY ANALYZING TUMOR CELLS IN A BODY FLUID AND TEST KITS SUITED THEREFOR</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON TUMORZELLEN IN EINER KÖRPERFLÜSSIGKEIT UND DAZU GEEIGNETE TESTKITS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for quantitatively analyzing tumor cells in a body fluid. According to the inventive method, the test sample to be examined is first subjected to a method for accumulating or depleting tumor cells, and a reaction is carried out on the accumulated or depleted tumor cells. During the reaction, the mRNA which codes for the catalytic subunit of the telomerase is specifically amplified, and afterwards, the quantity of amplified nucleic acid is quantitatively analyzed. The invention also relates to test kits suited for the invented method.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Offenbart wird ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den angereicherten bzw. abgereicherten Tumorzellen eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert wird, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Tumorzellen in
einer Körperflüssigkeit und dazu geeignete Testkits

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den angereicherten bzw. abgereicherten Tumorzellen eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.

Nahezu alle soliden malignen Tumore haben das Potential zur Metastasenbildung. Der Prozeß der Metastasierung beinhaltet die Aussaat maligner Zellen als Mikrometastasen, zumeist auf dem Blut- bzw. Lymphweg in entfernte Organe und die Ausbildung autonomer Tochtergeschwülste. Das Ausmaß der Filiarisierung bestimmt die Prognose eines Tumorleidens.

Die Ansprüche von Tumorstadien- oder Nachsorgeprogrammen liegen in der Früherkennung von Primärtumoren bzw. eines Rezidivs oder einer Metastasierung noch bevor Metastasen

klinisch manifest werden. Dieses Ziel kann bislang mit den verfügbaren apparativen Techniken nicht zufriedenstellend erfüllt werden, insbesondere gibt es immer noch eine diagnostische Grauzone zwischen dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen und beginnender Metastasenbildung in Organen. Durch die Frühdiagnose zirkulierender maligner Zellen z.B. im peripheren Blut eines Tumornachsorgepatienten könnte frühzeitig, d.h. noch vor einer manifesten Organmetastasierung, eine möglicherweise kurative Immunmodulations- oder Polychemotherapie eingeleitet werden. Die Quantifizierung der Tumorzellen im peripheren Blut vor und nach der Therapie stellt dabei eine wichtige Kontrolle dar.

Die Lebensdauer eukaryontischer Zellen wird entsprechend der Telomer-Hypothese durch die Länge der Termini der chromosomalen DNA, der Telomere, bestimmt. Telomere spielen deshalb nach dieser Theorie die Rolle einer mitotischen Uhr. Bedingt durch den Replikationsmechanismus der DNA-Polymerasen werden die Telomere nach jeder Zellteilung um die Länge des Replikationsprimers verkürzt. Dadurch werden die Chromosomen nach jeder Zellteilung kürzer und erreichen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen eine kritische Länge. Die Zellen gehen dann in eine seneszente Phase über, in der sie sich nicht mehr teilen und schließlich absterben. In einigen Fällen kann jedoch dieser Regulationsmechanismus durch ein Ribonukleoprotein, die Telomerase, übergangen werden und die Zellen werden immortal. Die Telomerase synthetisiert die bei der Replikation verlorengegangenen Telomersequenzen an das 5'-Ende der Chromosomen, wobei die RNA-Komponente des Proteins (human Telomerase RNA component, hTR) als Matrize dient und ein Teil der Proteinkomponente die katalytische Untereinheit (human Telomerase Reverse Transcriptase, hTRT) bildet.

Zu den Zellen mit aktiver Telomerase und unbegrenzter Lebensdauer im Menschen gehören vor allem die Keimzellen und hämatopoetischen Stammzellen, die sich während der gesamten Lebenszeit eines Individuums teilen können. Darüber hinaus werden auch in aktivierten B- und T-Lymphozyten des Menschen erhöhte Telomerase-Aktivitäten gefunden. Neben dieser normalen physiologischen Rolle der Telomerase kann in etwa 90-95% aller menschlichen Tumorgewebe eine erhöhte Telomerase-Aktivität gefunden werden. Daher kann die Telomerase-Aktivität von Tumorzellen die Grundlage für ein Nachweissystem für disseminierte zirkulierende Tumorzellen in Körperflüssigkeiten bilden, die potentiell zu Metastasen führen können.

Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein mit reverser Transkriptaseaktivität [Shippen-Lentz et al. (1990), Science 247: 546], das als Matrize eine integrale RNA-Sequenz zur unabhängigen DNA-Synthese benutzt [Greider et al. (1989). Nature 337: 331], mit der neue telomere DNA an die Enden der Chromosomen synthetisiert werden. Telomere bestehen aus hoch konservierten (TTAGGG)_n Tandemsequenzen von ca. 5-15 Kilobasen (kb) Länge/Zellgenom und haben die Aufgabe die Chromosomen an der Kernmembran zu stabilisieren und schützen die kodierende genomische DNA vor unkontrollierter Rekombination und Degradation [Mehle et al. (1994). Cancer Res 54: 236]. Während in den niederen Eukaryonten ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Verkürzung der Chromosomenenden und der de novo Synthese von telomeren Sequenzen durch die Telomerase postuliert wird, zeigen normale humane somatische Zellen eine niedrige oder nicht nachweisbare Telomeraseaktivität. Darüber hinaus ist die Telomerase im Gegensatz zu anderen DNA Enzymen nicht wachstumsreguliert, denn keine der aktiv proliferierenden Zellkulturen zeigte nachweisbare Telomeraseaktivität. Einzig Keimzellen und fast alle Tumorzelllinien [Ohyashiki et al.

(1994). Cancer Genet Cytogenet 78: 64; Rogalla et al. (1994). Cancer Genet Cytogenet 77: 19; Schwartz et al. (1995). Cancer 75: 1094] und Tumorgewebe (Lunge, [Hiyama et al. (1995). Oncogene 10: 937; Shirotani et al. (1994). Lung Cancer 11: 29], Nieren [Mehle et al. (1994). Cancer Res 54: 236], Ovarien [Chadeneau et al. (1995). Cancer Res 55: 2533] und Blut [Counter et al. (1995). Blood 85: 2315]) zeigen meßbare Telomeraseaktivität und eine konstante Telomerlänge, die durch eine unendliche Zahl von Zellteilungen hindurch beibehalten wird. Daher kann die Aktivierung der Telomerase mit der damit verbundenen Stabilisierung der Telomerlängen als kritischer Schritt in Richtung Immortalisierung von somatischen Zellen gewertet werden.

Feng et al. gelang die Klonierung der integralen RNA-Sequenz der humanen Telomerase (hTR), die auf dem distalen Segment (q) von Chromosom 3 kodiert wird. Die Autoren konnten mittels kompetitiver Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine signifikante Erhöhung der Telomeraseexpression in Tumorgeweben sowie in den Keimgeweben gegenüber normalen somatischen Zellen belegen [Feng et al. (1995), Science 269: 1236]. Ein Antisense-Konstrukt der hTR-Sequenz verursachte den Zelltod (Apoptose) in transfizierten HeLA-Zellen. Diese Daten belegen die stringente Repression der Telomerase in somatischen Geweben als auch die Tatsache, daß malignes Wachstum von der Präsenz immortaler Zellen und von der Aktivierung der Telomerase abhängig ist.

Nakamura et al. charakterisierten 1997 einen Proteinbestandteil der katalytischen Untereinheit der menschlichen Telomerase. Im Vergleich mit der RNA-Komponente der menschlichen Telomerase (hTR) korreliert die für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (hTRT) kodierende mRNA wesentlich stärker mit der Telomeraseaktivität (Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR

(1997): Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science 277: 955-9) und ist damit besser zur Krebsdiagnostik geeignet. Meyerson et al. lokalisierten die hTERT auf dem menschlichen Chromosom 5p und bestätigten die starke Korrelation des hTERT mRNA-Nachweises mit der enzymatischen Aktivität der menschlichen Telomerase (Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA (1997): hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell 90: 785-95).

Die Standardmethode zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Telomerase ist z.Zt. der TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) [Kim et al. Science (1994) 266: 2011]. Dabei synthetisiert die im Zellextrakt vorhandene Telomerase Extensionsprodukte, die anschließend in einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert werden. Eine densitometrische Auswertung der Amplifikationsprodukte erlaubt anschließend eine Quantifizierung der Telomerase-Aktivität. Die Sensitivität des TRAP-Assays wurde in Abhängigkeit des Probenmaterials, des Versuchslabors und des verwendeten Protokolls mit 4-100 Zellen/Ansatz angegeben. Da im TRAP-Assay der Rohextrakt von lysierten Zellen bzw. Geweben verwendet wird, ist diese Methode im hohen Maße störanfällig gegenüber Inhibitoren der in der PCR verwendeten DNA-Polymerase (Taq-Polymerase).

Der TRAP-Assay wird beispielsweise in der WO 98/02581 zur Diagnose von präkanzerösen oder kanzerösen Schäden des Cervix, Endocervix, der Vagina oder Vulva eingesetzt.

Die WO 97/18322 offenbart ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen, bei dem zuerst mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die RNA-Komponente der Telomerase spezifisch amplifiziert wird, und

anschließend die Menge an ⁶amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird.

Die WO 96/01835 offenbart ebenfalls ein Verfahren zum Nachweis der RNA-Komponente der Telomerase in Zellen oder Zellproben.

Trotz der bekannten Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen besteht weiterhin ein Bedürfnis nach zuverlässigen und einfachen Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem man Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit quantitativ bestimmen kann.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den angereicherten bzw. abgereicherten Tumorzellen eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.

Bei der Körperflüssigkeit, in der Tumorzellen quantifiziert werden sollen, kann es sich um jede menschliche oder tierische Körperflüssigkeit oder um eine Dispersion von Zellgewebe handeln. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Blut, insbesondere peripheres Blut wie venöses oder arterielles Blut, Lymphe, Urin, Stuhl, Exsudate, Transudate, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertem Körpergewebe. Bei den Flüssigkeiten aus

natürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um seröse Flüssigkeiten wie Peritoneal- und Pleuraflüssigkeiten handeln, bei den Flüssigkeiten aus unnatürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um Flüssigkeiten aus Zysten handeln.

Bevorzugte Körperflüssigkeiten sind Blut, Knochenmark, Lymphe, seröse Flüssigkeiten aus Körperhöhlen sowie Urin, wobei Blut und Urin besonders bevorzugt sind. Urin eignet sich insbesondere zur Anreicherung von Zellen von Blasentumoren.

Beispielsweise wird peripheres Blut durch Punktion einer Arterie, Vene oder Fingerkuppe dem Probanden entnommen und nach einem Anreicherungs- bzw. Abreicherungsverfahren, die in der Probe enthaltenen Tumorzellen in einen RNA-Lysispuffer der beispielsweise Harnstoff oder vorzugsweise Guanidinium Isothiocyanat enthält, überführt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren und die Nukleinsäuren aus den Zellen freizusetzen [siehe z. B. Chomczynski et al. (1987) Anal. Biochem. 162, 156]. Die Isolierung der Nukleinsäuren aus dem stark salzhaltigen Medium des RNA-Lysispuffers kann beispielsweise mittels Siliciumdioxid-Partikel erfolgen, an die sämtliche Nukleinsäuren binden können [Boom et al. (1990) J. Clin. Microbiol., 29, 495]. Danach werden die Partikel mit geeignetem Puffer mehrmals gewaschen und die gebundenen Nukleinsäuren eluiert. Anschließend ist es vorteilhaft die in der Probe eventuell vorhandene genomische DNA mittels RNase-freier DNase in einem geeigneten Puffer zu hydrolysieren, damit bei der späteren Amplifizierung der für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierenden mRNA keine falsch-positiven Ergebnisse bzw. ein zu großes Hintergrundrauschen durch falsche Amplifizierungssignale aufgrund eventuell noch vorhandener DNA entstehen. Anschließend erfolgt im allgemeinen eine Inaktivierung der

DNase beispielsweise durch Phenolextraktion und/oder Hitzedenaturierung. Vor oder vorzugsweise nach Behandlung der Probe mit DNase kann vorteilhafterweise noch eine weitere Reinigung der in der Probe vorhandenen RNA beispielsweise mittels chromatographischer Methoden wie die Ionenaustausch-Chromatographie vorzugsweise an Kieselgel erfolgen.

Zur Kontrolle, ob noch eventuell störende genomische DNA in der Probe vorhanden ist, kann anschließend eine Amplifizierungsreaktion mit den unten beschriebenen Telomerase-spezifischen Oligonukleotid-Primern durchgeführt werden, wobei die in der Probe vorhandene RNA vorher nicht in cDNA durch eine reverse Transkriptionsreaktion umgeschrieben wird. Nur für den Fall, daß die Probe frei ist von Telomerase-spezifischer DNA erfolgt keine Amplifikation mit der Folge, daß keine amplifizierte DNA gemessen werden kann.

Anschließend erfolgt eine Umschreibung der in der Probe vorhandenen RNA in cDNA im allgemeinen mit Hilfe der reversen Transkriptionsreaktion z. B. mit der AMV reversen Transkriptase. Das Verfahren ist allgemein bekannt und beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform der reversen Transkription kann auch eine thermostabile RNA-abhängige DNA Polymerase, wie in WO 90/07641 beschrieben, verwendet werden. Als Oligonukleotid-Primer für die reverse Transkriptase eignen sich beispielsweise vorteilhafterweise die unten beschriebenen Oligonukleotid-Primer oder Random Primer einer bestimmten Länge.

Die anschließende Amplifizierung kann beispielsweise mit einer DNA-Polymerase z. B. nach der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt werden (siehe z. B. U.S. Patente Nr. 4,683,195; 4,683,202; 4,965,188) oder vorzugsweise mit einer

RNA-Polymerase nach z. B. der isothermalen Nukleinsäuresequenz-basierenden Amplifikation (NASBA). In jedem Fall benötigt man für die Amplifizierung spezifische Oligonukleotid-Primer, die von der zu amplifizierenden Nukleinsäure abgeleitet sind. Bei der vorliegenden Erfindung kann jeder beliebige Sequenzabschnitt der für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierenden cDNA für die Synthese der Oligonukleotid-Primer verwendet werden. Vorzugsweise sind die Oligonukleotid-Primer ca. 20 bis ca. 40, vorzugsweise ca. 25 bis 35 Nukleotide lang. Das Amplifikationsprodukt ist im allgemeinen ca. 100 bis ca. 2000 Basen, vorzugsweise ca. 200 bis ca. 1500 Basen, insbesondere ca. 450 bis ca. 550 Basen lang. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind insbesondere folgende Oligonukleotid-Primer bevorzugt, die aus der Sequenz gemäß Abb. 1 abgeleitet wurden:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können. Der Oligonukleotid-Primer hTRT1 entspricht dem 5'-Primer und hTRT2 dem 3'-Primer. Das Amplifikationsprodukt ist 513bp lang. Die Primer können beispielsweise synthetisch nach der Triestermethode hergestellt werden [Matteucci et al., (1981), J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191]. Als DNA-Polymerase kann beispielsweise eine nicht-thermostabile DNA-Polymerase wie die T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase, E. coli Polymerase I oder das Klenow Fragment von E. coli oder vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase wie die Taq-Polymerase (siehe z. B. U.S. Patent Nr. 4,889,818) verwendet werden.

Das allgemeine Prinzip der PCR-Reaktion besteht nun darin, daß während mehrerer sich wiederholender Reaktionszyklen die

DNA hitzedenaturiert wird und in Anwesenheit geeigneter Oligonukleotid-Primer mit gegenseitiger Orientierung der Einzelstrang mit Hilfe der DNA-Polymerase zum Doppelstrang wieder ergänzt wird. Danach wird der Zyklus wiederholt bis sich genügend DNA zur Quantifizierung nach einer der unten beschriebenen Methoden gebildet hat. Im allgemeinen sind ca. 20 bis ca. 40 Zyklen, vorzugsweise ca. 30 bis ca. 35 Zyklen ausreichend.

Bei der NASBA-Methode (auch 3SR-System genannt) wird zumindest ein Oligonukleotid-Primer, vorzugsweise hTRT2 verwendet, der einen Promotor für die RNA Polymerase, vorzugsweise für die T7 RNA Polymerase enthält [siehe z. B. Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1874-1878 oder Kievits et al. (1991), J. Virol. Methods, 35, 273-286]. Zuerst wird, wie oben bereits näher beschrieben, die RNA mit Hilfe eines der oben beschriebenen Oligonukleotid-Primer und einer reversen Transkriptase, vorzugsweise der AMV reversen Transkriptase, in cDNA umgeschrieben. Das Reaktionsprodukt ist ein RNA:DNA-Doppelstrang, dessen RNA-Komponente anschließend mittels einer RNase, vorzugsweise der RNase H, zu einem DNA-Einzelstrang abgebaut wird. Unter Verwendung eines der oben beschriebenen Oligonukleotid-Primer wird der DNA-Einzelstrang mittels einer DNA Polymerase zum DNA-Doppelstrang ergänzt. Als DNA Polymerase eignet sich vorzugsweise wiederum die AMV reverse Transkriptase, da diese Transkriptase nicht nur eine RNA-abhängige DNA Polymeraseaktivität, sondern auch eine DNA-abhängige DNA Polymeraseaktivität besitzt. Das Reaktionsprodukt ist ein DNA-Doppelstrang, der den Promotor für z. B. die T7 RNA Polymerase enthält. Anschließend synthetisiert die RNA Polymerase wieder einen sogenannten "antisense" RNA-Strang und der Zyklus kann von neuem beginnen. Im allgemeinen sind ca. 20 bis ca. 40 Zyklen, vorzugsweise ca. 30 bis ca. 35 Zyklen ausreichend, um genügend Amplifikationsprodukt,

11

vorzugsweise "antisense" RNA, für die anschließende Quantifizierung zu liefern.

Für die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte können diese beispielsweise mit interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielsweise Ethidiumbromid gefärbt und direkt z. B. in einem Agarose- oder Polyacrylamidgel unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Da die zu quantifizierenden Amplifikationsprodukte jedoch nur dann in direkter Korrelation zu der eingesetzten Menge RNA stehen, wenn sich die Amplifikations-Reaktion in einer linearen Phase befindet, ist es zum Zwecke der Quantifizierung notwendig, den Reaktionsverlauf der Amplifizierung zu messen. Dazu müssen die Reaktionsprodukte nach jedem Zyklus der Amplifizierung gemessen werden, wobei anhand des Reaktionsverlaufs der lineare Bereich bestimmt wird, in welchem dann mit hinreichender Sicherheit eine Quantifizierung vorgenommen werden kann. Es ist somit vorteilhaft, wenn die Amplifikationsprodukte bereits während der Amplifizierung markiert werden, und die Kinetik der Amplifikation kontinuierlich schon während des Amplifikationsvorganges gemessen wird. Dies wird beispielsweise bei der TaqManTM-PCR (Hoffmann-La Roche) mit Hilfe einer für das Amplifikationsprodukt spezifischen Sonde durchgeführt. Die Sonde ist an ihrem 3'- und 5'-Ende mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ("Reporter" und "Quencher") markiert und liegt während der gesamten PCR im Reaktionsgefäß vor. Bedingt durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der zur Amplifizierung verwendeten DNA-Polymerase (AmpiTaqTM, Hoffmann-La Roche) wird während der Verlängerung des DNA-Tochterstranges die Sonde hydrolysiert und dabei der Quencher vom Reporter getrennt. Dadurch wird der Quencheffekt aufgehoben und die vom "Reporter" emittierte

charakteristische Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Intensität dieser Fluoreszenz ist direkt proportional zu den PCR-Produkten, die pro Synthese-Zyklus amplifiziert wurden.

Als Markierungen eignen sich beispielsweise auch radioaktive Markierungen, Biotinmarkierungen, Fluoreszenz- oder Elektrochemolumineszenz(ECL)markierungen. Die Markierungen tragen in der Regel die Nukleotide als Ausgangsstoffe für die Amplifizierung durch die DNA- oder RNA-Polymerase. Die radioaktiv markierten Amplifikationsprodukte (z. B. PCR- oder NASBA-Produkte) können durch Messung der Radioaktivität, die Biotin-markierten Amplifikationsprodukte über einen Avidin- oder Streptavidin-tragenden Farbstoff, die fluoreszenzmarkierten Amplifikationsprodukte mit einem Fluorometer und die elektrochemolumineszenz-markierten Amplifikationsprodukte mit einem ECL-Detektor nachgewiesen werden. Die am meisten bevorzugte Nachweismethode ist jedoch die automatische in vitro Hybridisierung, z.B. wie bei der TaqManTM-PCR, schon während des Amplifikationsvorganges.

Im Unterschied zur "Echt-Zeit"-Quantifizierung von PCR-Produkten wie bei der TaqManTM-PCR ist es auch möglich PCR-Produkte mit Hilfe von Verdünnungsreihen zu quantifizieren. Dabei wird die RNA bzw. die entsprechende cDNA in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Dadurch erhält man ähnlich wie bei der "Echt-Zeit"-Quantifizierung eine sigmoidale Reaktionskinetik bei der wiederum im linearen Bereich die Amplifikationsprodukte proportional zum Ausgangsmaterial vorliegen. Der Nachweis der PCR-Produkte wird mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten oder radioaktiv-markierten Desoxynukleotiden durchgeführt, die von der DNA-Polymerase während der Amplifizierung direkt in die PCR-Produkte eingebaut werden. Desweiteren werden Oligonukleotide (sog. Primer, die bei der PCR zur Initialisierung der Synthese des Tochterstranges notwendig sind und nach der PCR in allen Amplifikationsprodukten am 5'-

und 3'-Ende der DNA eingebaut vorliegen) mit bestimmten Molekülen markiert (beispielsweise Biotin), um die Amplifikationsprodukte nach der PCR mit Hilfe von spezifischen Antikörpern oder Streptavidin zu immobilisieren. Diese Immobilisierung kann beispielsweise in einer Mikrotiterplatte erfolgen, in der dann mit Hilfe einer Molekül-markierten spezifischen Sonde, die an die Amplifikationsprodukte hybridisiert, und eines Enzymgekoppelten (beispielsweise einer Peroxidase) Antikörpers gegen das Markermolekül der Sonde eine Farbreaktion erfolgt. Diese Farbreaktion läßt sich anschließend photometrisch erfassen.

Das Oligonukleotid für einen Nachweis durch die in vitro Hybridisierung trägt im allgemeinen die oben beschriebenen Markierungen, wobei in Verbindung mit der NASBA-Amplifizierungsmethode die Hybridisierungsprobe eine Elektrochemolumineszenzmarkierung, vorzugsweise eine Tris[2,2-bipyridin]ruthenium[II]-Komplexmarkierung tragen kann [siehe z. B. van Gemen et al. (1994), J. Virol. Methods, 49, 157-168].

Eine genaue und sensitive Quantifizierung der Amplifikationsprodukte kann vorteilhafterweise auch dadurch erreicht werden, daß eine bestimmte Menge von einer oder mehreren bekannten Nukleinsäuren (Standard-Nukleinsäuren) co-amplifiziert wird [siehe z. B. van Gemen et al. (1993), J. Virol. Methods, 43, 177-188]. Hierbei wird zu den unbekannten Mengen der zu untersuchenden Probe eine unterschiedliche, jedoch genau bekannte Menge der co-amplifizierenden Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren beispielsweise in Form einer Verdünnungsreihe hinzugegeben und die Amplifikationsprodukte der Probe und einer oder mehrerer co-amplifizierender Standard-Nukleinsäuren in unabhängigen Ansätzen quantitativ bestimmt. Ein Vergleich der Meßergebnisse ergibt die Menge

der zu bestimmenden für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierenden mRNA in der Probe.

Vorteilhafterweise wird die co-amplifizierende Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren mit demselben Oligonukleotid-Primer amplifiziert wie die zu untersuchende Probe und die Amplifikationsprodukte haben auch im wesentlichen die gleiche Länge. Besonders bevorzugt haben die co-amplifizierenden Nukleinsäuren dieselbe Sequenz wie das Amplifikationsprodukt der zu bestimmenden Probe mit Ausnahme von ca. 20 Nukleinsäuren zwischen den Oligonukleotid-Primer-Bindungsstellen, die eine willkürliche, jedoch bekannte Sequenz tragen. Dadurch können das zu bestimmende Amplifikationsprodukt in der Probe von dem co-amplifizierenden Amplifikationsprodukt beispielsweise über eine Hybridisierung, wie z. B. bei Sambrook et al. (supra) näher beschrieben, mit entsprechend komplementären markierten Oligonukleotiden unabhängig voneinander quantifiziert werden. Insbesondere ist es vorteilhaft, wenn mehrere, vorzugsweise drei, verschiedene co-amplifizierende Nukleinsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen der Probe zugesetzt werden, da hierdurch die Zahl der sonst einzeln durchzuführenden Amplifizierungsreaktionen reduziert werden kann [siehe van Gemen et al. (1994) J. Virol. Methods 49, 157-168]. Es ist auch insbesondere bevorzugt, die co-amplifizierenden Nukleinsäuren bereits zu dem oben beschriebenen RNA-Lysispuffer hinzuzugeben, da hierdurch der Einfluß möglicher Nukleinsäureverluste bei der nachfolgenden Aufarbeitung der Probe ausgeschlossen werden kann.

Als co-amplifizierende Standard-Nukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung eignen sich vorteilhafterweise RNA-Einzelstrang-Sequenzen, die durch in vitro Transkription beispielsweise mit der Sp6 oder T7 RNA Polymerase von Konstrukten hergestellt werden, die DNA oder cDNA der zu

amplifizierenden Probe enthalten und die jeweils mit einem randomisierten Sequenzaustausch von beispielsweise ca. 10 bis ca. 30, vorzugsweise ca. 20 Nukleotiden ausgestattet sind.

Die Konstrukte bestehen bevorzugterweise aus einem Transkriptionsvektor mit einer Bindungsstelle für die Sp6 oder T7 RNA Polymerase zwischen einer sogenannten "Multiple Cloning Site", in welcher die DNA oder cDNA der zu amplifizierenden Probe kloniert worden ist. Durch eine selektive Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen, vorzugsweise mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen, kann die klonierte Sequenz geöffnet und ein Stück einer bestimmten Länge herausgeschnitten und durch ein gleich langes Stück beispielsweise mit Hilfe der T4 Ligase ersetzt werden. Das klonierte Stück kann einen Sequenzaustausch beliebiger Länge, beispielsweise ca. 10 bis ca. 30, vorzugsweise ca. 20 Nukleinsäuren enthalten und liegt vorzugsweise zwischen den Oligonukleotid-Primer-Bindungsstellen. Diesen Vorgang kann man wiederholen, um an gleicher Stelle Insertionen mit anderen Nukleinsäure-Sequenzen vorzunehmen. Lassen sich keine geeigneten Schnittstellen finden, z. B. weil auch im Vektor geschnitten wird, müssen künstliche Schnittstellen geschaffen werden. Dies kann beispielsweise mittels rekombinanter PCR geschehen, die im wesentlichen bei Higuchi et al. [Higuchi, R. (1988). Nucleic Acid Res 16: 7351-7367; Higuchi, R. (1990). M. Innis A. et al. eds. San Diego, New York, Berkley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press, Inc. 177-183] und im experimentellen Teil der vorliegenden Erfindung beschrieben ist.

Eine bevorzugte Verwendung im Rahmen der Erfindung finden in vitro transkribierte RNA-Einzelstrang-Sequenzen von Konstrukten, welche

a) die gesamte cDNA entsprechend der für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase kodierenden mRNA enthalten und

b) in welchen ein randomisierter Sequenzaustausch von ca. 20 Nukleotiden eingeführt worden ist.

Da sich die Standard-Nukleinsäuren (beispielsweise hTRTKa, hTRTKb und hTRTKc) untereinander und von der Wildtyp-Sequenz beispielsweise nur durch eine randomisierte und bekannte 20 Basenpaar lange Sequenz unterscheiden, können die Amplifikationsprodukte der Standard-Nukleinsäuren und der Wildtyp-Sequenz durch komplementäre Bindung von markierten Oligonukleotiden in vier getrennten Ansätzen nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA, werden die entsprechenden reverse komplementären Sequenzen verwendet.

Danach werden die individuellen Amplifikationsmengen von dem Wildtyp- und den Standard-Nukleinsäuren bestimmt. Im Vergleich zu den unterschiedlichen Amplifikationsmengen der Standard-Nukleinsäuren bei bekannter Ausgangsmenge (z. B. hTRTKa: 10^2 , hTRTKb: 10^4 und hTRTKc: 10^6 Moleküle) läßt sich die unbekannte Ausgangsmenge der Wildtypsequenz errechnen. Daraus läßt sich dann auf die Anzahl der Metastasen pro abgenommener Körperflüssigkeit schließen.

Als interne positive Kontrolle des Verfahrens und der zu untersuchenden Probe kann zusätzlich eine Nukleinsäure amplifiziert und nachgewiesen werden, die im allgemeinen immer in einer Körperflüssigkeit vorkommt. Als geeignete Nukleinsäuren sind beispielsweise die mRNA kodierend für β -Globin oder für die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) zu nennen (siehe z. B. GB 2 260 811), die immer in

den Zellen der Körperflüssigkeit vorkommen. Geeignete Oligonukleotid-Primer für die humane β -Globin mRNA sind beispielsweise Primer mit den Sequenzen:

5' ACCCAGAGGT TCTTTGAGTC 3' (Glob 1) und
5' TCTGATAGGC AGCCTGCACT 3' (Glob 2).

Weitere interne positive Kontrollen des Verfahrens und der zu untersuchenden Probe können zusätzlich zellspezifische Nukleinsäuren, wie β -Aktin mRNA, mit den Primern (Nakajima-Iiji, S., Hamada, H., Reddy, P., Kakanuga, T. (1985): Molecular structure of the cytoplasmatic β -actin gene: Interspezies homology of sequences in the introns. Proc Natl Acad Sci USA 82, 6133-7):

5' GATGATGATATCGCCGCGCTCGTC 3' (Act 1)
5' CTCAAACATGATCTGGGTCATCTTC 3' (Act 2)

oder T-Zell spezifische Nukleinsäuren, wie die mRNA des T-Zell-Rezeptors, mit den Primern (Toyonaga, B., Yoshikai, Y., Vadasz, V., Chin, B., Mak, T.W. (1985): Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region of the human T-cell receptor β chain. Proc Natl Acad Sci USA 82, 8624-8):

5' GAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAG 3' (TCR 1)
5' GATCTCATAGAGGATGGTGGCAGACAG 3' (TCR 2)

sein.

Die Oligonukleotid-Primer können gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten.

Zur Vermeidung bzw. Reduzierung falsch positiver Ergebnisse bzw. des sogenannten Hintergrundrauschens, das durch

eventuell vorhandene Telomeraseaktivitäten von Nicht-Tumorzellen verursacht wird, wird die zu untersuchende Probe erfindungsgemäß zunächst einem Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen unterzogen. Hierzu ist es vorteilhaft, die entnommene Körperflüssigkeit in entsprechenden Verfahren entweder aufzureinigen oder zu Konditionen zu kultivieren, die für die kontaminierenden Telomerase-positiven Nicht-Tumorzellen ungünstig, jedoch für die vorhandenen Tumorzellen günstig sind.

Im Falle der Aufreinigung sollen insbesondere aus der zu untersuchenden Probe Stammzellen und/oder aktivierte Immunzellen abgereichert oder Tumorzellen angereichert werden. Da in der Regel die einzelnen Zellen spezifische Oberflächenmarker besitzen ist eine Abtrennung oder Anreicherung der Zellen über die Immunabsorption besonders vorteilhaft. Als Methoden eignen sich beispielsweise die magnetische (MACS) oder die fluoreszenzaktivierte (FACS) Zellsortierung [siehe z. B. Göttlinger & Radbruch (1993) mta, 8, 530-536, No. 5]. So können hämatopoetische Stammzellen beispielsweise über ihren Oberflächenmarker CD34 mittels MACS von der Blutprobe abgetrennt werden [Kato & Radbruch (1993) Cytometry, 14, 384-392]. B-Zellen lassen sich beispielsweise über ihre Oberflächenmarker CD10, CD19 und/oder CD20 und T-Zellen über CD45RA und/oder CD7 abtrennen. Tumorzellen können über ihre spezifischen Tumormarker, z. B. CEA, angereichert werden. Neben MACS oder FACS eignen sich auch besonders an sogenannte käuflich erhältliche Magnetbeads (z. B. Dynabeads M450, Dynal Corp.) gebundene Antikörper gegen die spezifischen Oberflächenmarker zur Abreicherung oder Anreicherung der entsprechenden Zellen.

Die Isolierung mononukleärer Zellen kann nach folgenden Methoden erfolgen:

spezifische Lyse der Erythrozyten (Bsp. Ammoniumchlorid/hypertonischer Schock), spezifische Lyse mononukleärer Blutzellen (Bsp. L-Leucyl-L-Leucine-Methylester für Monozyten und zytotoxische Zellen), negativ/positiv Selektion mittels spezifischer Oberflächenmarker (Bsp. negativ: CD 4, 8, 34 etc.; positiv: Ber-EP4, AUA1, CEA), Dichtegradienten-Zentrifugation euploider vs. aneuploider Zellen oder Dichtegradienten-Zentrifugation von mononukleären kernlosen Zellen (Bsp. Ficoll).

In den 60er- und 70er-Jahren, als Methoden wie beispielsweise FACS oder MACS noch nicht zur Verfügung standen, wurden Tumorzellen von hämatopoetischen Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt (J.A. Fleming et al., J. clin. Path. (1967), 20, 145). Entsprechend dieser Daten besitzen Tumorzellen eine spezifische Dichte von 1,040-1,080, während Erythrozyten und polymorphnukleäre Leukozyten eine höhere Dichte aufweisen. Lymphozyten weisen hingegen eine spezifische Dichte im Bereich von 1,060-1,075 auf und überschneiden sich somit mit der spezifischen Dichte von Tumorzellen. Eine vollständige Abtrennung der ebenfalls Telomerase-aktiven Lymphozyten von den Tumorzellen über deren Dichteunterschiede sollte somit nicht möglich sein. So zeigte auch die Verwendung einer Standardlösung zur Isolierung von Lymphozyten, wie z.B. Histoprep[®] mit einer Dichte von 1,077 g/ml, daß Lymphozyten von gesunden Blutspendern mit einer Dichte von bis zu 1,077 g/ml eine Telomerase-Aktivität aufweisen.

Für eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde nun gefunden, daß die Anreicherung der Tumorzellen dadurch erfolgen kann, daß man ein Zellseparationsmedium mit einer Dichte im Bereich von

1,055 bis $< 1,070$ g/ml mit der Körperflüssigkeit, die die Tumorzellen enthält, überschichtet und zentrifugiert. Durch die Verwendung des speziellen Zellseparationsmediums werden die in der Körperflüssigkeit vorhandenen Zellen so aufgetrennt, daß die aufgrund ihrer Dichte zusammen mit den Tumorzellen angereicherten Lymphozyten keine Telomerase-Aktivität aufweisen.

Das Anreicherungsverfahren verwendet ein Zellseparationsmedium als diskontinuierlichen Gradienten, das mit der Körperflüssigkeit überschichtet wird. Durch Zentrifugation werden die Zellen ihrer spezifischen Zelldichte nach aufgetrennt und können in einzelnen Fraktionen abgenommen werden. Der spezifische Dichtegrad des Zellseparationsmediums erlaubt eine fast vollkommene Trennung von Tumorzellen von den in den Körperflüssigkeiten befindlichen korpuskulären Anteilen, speziell den Zellen des roten und weißen Blutsystems. Darüber hinaus erlaubt es das Verfahren, Telomerase-positive von Telomerase-negativen hämatopoetischen Zellen zu trennen, wobei sich die angereicherten Tumorzellen nach der Zentrifugation in der gleichen Fraktion befinden wie die Telomerase-negativen hämatopoetischen Zellen, so daß eine anschließend nachgewiesene Telomerase-Expression in dieser Fraktion zweifelsfrei auf vorhandene Tumorzellen zurückgeführt werden kann.

Überraschend ist auch, daß durch die gegenüber dem Stand der Technik nur geringfügige Verringerung der Dichte des Zellseparationsmediums eine erhebliche Reduzierung der kontaminierenden Blutzellen erreicht wird. Dadurch wird die Gesamt-Zellzahl signifikant verringert, ohne daß signifikante Verluste an Tumorzellen auftreten, wodurch z.B. das Screening von mikroskopischen Präparaten erheblich vereinfacht und im klinischen Maßstab erst möglich wird.

Es wurde gefunden, daß eine besonders gute Trennleistung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte im Bereich von 1,060-1,067 g/ml, bevorzugter von 1,060-1,065 g/ml und besonders bevorzugt von etwa 1,065 g/ml erzielt wird.

Die Zentrifugation wird vorteilhaft bei ca. 1.000 x g über ca. 30 Minuten durchgeführt. Die Temperatur während der Zentrifugation beträgt vorzugsweise ca. 4°C. Insbesondere hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Zentrifugation mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremsen durchgeführt wird, damit das Zellseparationsmedium und die Körperflüssigkeit zu Beginn der Zentrifugation bzw. die Fraktionen am Ende der Zentrifugation nicht miteinander vermischt werden.

Als Zellseparationsmedium läßt sich im Prinzip jede geeignete Flüssigkeit gewünschter Dichte verwenden. Das Zellseparationsmedium sollte nicht mit der Körperflüssigkeit oder den darin enthaltenen Zellen reagieren. Vorteilhaft kann beispielsweise Ficoll oder Percoll verwendet werden, wobei die Lösungen jeweils nach Anweisungen des Herstellers auf die gewünschte Dichte gebracht werden. Beispielsweise berechnet sich die Menge der zu verdünnenden Percoll-Stammlösung mit einer Dichte von 1,13 g/ml, die zur Herstellung von 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte (dd) benötigt wird, nach der Formel:

$$100 \text{ ml} \times (dd - 0,106 - 0,9) / 0,13.$$

10% der Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte bestehen immer aus einer 1,5 M NaCl-Lösung, um eine physiologische Osmolarität zu gewährleisten. Die Differenz zwischen der nach der vorstehenden Formel berechneten Menge an Percoll-Stammlösung (Dichte 1,13 g/ml) und der Salzlösung zu 100 ml wird dann mit Wasser aufgefüllt.

Damit läßt sich eine Percoll-Arbeitslösung mit einer Dichte von 1,060 g/ml beispielsweise wie folgt herstellen:

41,54 ml	der Percoll-Stammlösung (Dichte von 1,13 g/ml)
48,46 ml	H ₂ O
<u>10,00 ml</u>	<u>1,5 M NaCl</u>

100,00 ml Percoll-Arbeitslösung, dd 1,060 g/ml

Die angegebenen Dichten beziehen sich auf eine Temperatur von 20°C. Vorteilhaft werden die Arbeitslösungen bei Raumtemperatur hergestellt und beispielsweise mit Hilfe von Marker-Beads einer definierten Dichte überprüft.

Wenn peripheres Blut als Körperflüssigkeit eingesetzt wird, wird dieses vorteilhaft in einer gerinnungshemmenden Substanz abgenommen und vor dem Überschichten des Zellseparationsmediums mit einem Verdünnungsmittel verdünnt. Als gerinnungshemmende Substanzen werden bevorzugt EDTA oder Citrat eingesetzt, als Verdünnungsmedium eignet sich beispielsweise PBS. Das Blut wird vorzugsweise im Verhältnis von ca. 1:1 verdünnt. Als peripheres Blut eignet sich venöses oder arterielles Blut.

Die zu untersuchende Körperflüssigkeit wird für die Anreicherung der Tumorzellen entsprechend gängiger Standardprotokolle entnommen bzw. gesammelt. In Abhängigkeit von der Art der Körperflüssigkeit wird diese dann entweder zunächst mit einem Verdünnungsmittel, bevorzugt einem Puffer, verdünnt oder direkt unverdünnt in einem Zentrifugationsgefäß über das Zellseparationsmedium geschichtet. Alternativ kann die Körperflüssigkeit zuvor bei beispielsweise 1.000 x g für ca. 10 Min. zentrifugiert und nach Resuspension der Zellen in einem Puffer über das Zellseparationsmedium geschichtet werden. Der bevorzugt verwendete Puffer ist Dulbecco PBS. Als

23

Zentrifugationsgefäß eignet sich insbesondere ein silikonisiertes Zentrifugationsgefäß bevorzugt aus Kunststoff mit einer Kapazität von beispielsweise 1-500 ml. Das Zentrifugationsgefäß sollte verschließbar sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Anreicherungsverfahrens werden der Körperflüssigkeit vor dem Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern. Diese Substanzen können zum Beispiel mit dem als Verdünnungsmittel verwendeten Puffer zugesetzt werden. Als Substanzen, die eine unerwünschte Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern, eignen sich beispielsweise EDTA, Citrat und ACD-A (acid citrate dextrose). Zusätzlich oder statt dessen kann die Körperflüssigkeit vor dem Überschichten von Substanzen befreit werden, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Ionen wie Magnesium- und Calciumionen.

Im Zentrifugationsgefäß wird das Zellseparationsmedium, das eine höhere Dichte als die zu untersuchende Körperflüssigkeit aufweist, vorgelegt, und anschließend mit der Körperflüssigkeit überschichtet. Je nach Größe des Zentrifugationsgefäßes und dem Volumen der Körperflüssigkeit, aus der die Tumorzellen angereichert werden sollen, kann das Zellseparationsmedium beispielsweise mit einem Volumen von 1-250 ml vorgelegt werden.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes nach der Zentrifugation und vor der Abnahme der an Tumorzellen angereicherten Interphase kurzzeitig stark abgekühlt wird um Zell-Kontaminationen zu verhindern. Beispielsweise können die im Zellpellet befindlichen Erythrozyten und Leukozyten dadurch immobilisiert werden, daß das untere Viertel des

Zentrifugationsgefäßes für ²⁴ 5-10 Minuten in flüssigem Stickstoff stark abgekühlt wird. Als Interphase wird vorliegend der Übergang zwischen dem Zellseparationsmedium und der darüberliegenden Körperflüssigkeit bezeichnet. In dieser Interphase reichern sich die Tumorzellen an und werden nach der Zentrifugation beispielsweise durch Absaugen dieser Phase gesammelt. Durch das starke Abkühlen des Zentrifugationsgefäßes wird ein Vermischen der Zellen aus den verschiedenen Phasen verhindert, wodurch falsch-positive Testergebnisse ausgeschlossen werden können.

Um einen möglichst einfachen Ablauf der Arbeiten zu sichern, kann die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt werden, das durch eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb, nachfolgend poröse Barriere oder Barriere genannt, in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellsuspensionsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird. Hierdurch wird ein Vermischen der zu untersuchenden Körperflüssigkeit im oberen Kompartiment mit dem Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment vor und nach dem Zentrifugationsschritt vermieden.

Die Position der porösen Barriere in dem Zentrifugationsgefäß kann dabei so gewählt werden, daß der Flüssigkeitsspiegel des Zellseparationsmediums entweder genau unterhalb, genau innerhalb oder genau oberhalb der porösen Barriere zu liegen kommt.

Die poröse Barriere kann beispielsweise eine Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweisen. Die poröse Barriere sollte darüber hinaus eine Festigkeit aufweisen, die es ihr erlaubt den Zentrifugationskräften unbeschadet Stand zu halten.

Eine bevorzugte Verwendung finden Barrieren mit einer porösen Beschaffenheit, die es erlaubt, daß bei der Zentrifugation Flüssigkeit sowie die korpuskulären Bestandteile des Blutes, wie die Zellen des roten und weißen Blutsystems, nicht aber die Tumorzellen die poröse Barriere ungehindert passieren können. Dies hat zur Folge, daß das Zellseparationsmedium während der Zentrifugation durch die poröse Membran in das obere Kompartiment gedrängt wird und die Tumorzellen und Thrombozyten auf einer Ebene oberhalb der Barriere zu liegen kommen. Hierzu eignen sich insbesondere poröse Barrieren mit einer Porengröße von 20-100 μm , vorzugsweise 20-30 μm .

Die poröse Barriere kann aus jedem geeigneten Material bestehen. Beispielsweise eignen sich Kunststoff, Metall, Keramik oder eine Mischung oder spezielle Legierung dieser Stoffe. Es kann aber auch jedes andere natürliche oder künstliche, geeignete Material eingesetzt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besteht die poröse Barriere aus einem hydrophoben Material oder ist mit einem hydrophoben Material beschichtet.

Mit Hilfe der porösen Barriere kann die zu untersuchende Körperflüssigkeit in das Zentrifugationsgefäß gefüllt werden, ohne daß sie sich mit dem darunterliegenden Zellseparationsmedium vermischt und somit die Anreicherung beeinträchtigen oder unmöglich machen kann.

Nach der Zentrifugation befinden sich die in der Körperflüssigkeit vorhandenen Tumorzellen in der Interphase des oberen Kompartiments des Zentrifugationsgefäßes. Die Flüssigkeit oberhalb der Interphase kann dann zu etwa 80% vorsichtig abgesaugt und verworfen werden. Bei dieser Restflüssigkeit handelt es sich beispielsweise bei der Verwendung von Blut als Körperflüssigkeit um ein Plasma/PBS-Gemisch, das die Serumproteine enthält.

Der verbleibende Überstand oberhalb der Barriere, in dem sich die Tumorzellen befinden, kann anschließend gesammelt und beispielsweise in ein frisches Zentrifugationsgefäß (vorzugsweise aus silikonisiertem Kunststoff und mit der gleichen Volumenkapazität wie das zuvor verwendete Zentrifugationsgefäß) überführt werden. Die poröse Barriere verhindert bei der Entnahme des verbleibenden Überstands ein Vermischen der Zellen des oberen und des unteren Kompartiments.

Vorteilhaft wird anschließend das obere Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes beispielsweise zweimal mit einem Puffer nachgewaschen und dieser wird ebenfalls in das frische Zentrifugationsgefäß überführt. Als Puffer eignen sich beispielsweise Dulbeccos PBS (3,9 mM EDTA, pH 8,0 ohne Calcium und Magnesium) oder NaCl/10% ACD-A (Guidlines for the collection, processing and storage of human bone marrow and peripheral stem cells for transplantation, prepared by the BCSH Blood Transfusion Task. Transfus. Med. 1994; 4: 165-72) oder NaCl/5% ACD-A/1% Albumin). Nach einer weiteren Zentrifugation beispielsweise bei 1.000 x g über ca. 10 Min. bei einer Temperatur von ca. 4°C können die gesammelten Zellen beispielsweise den Tumorzellnachweismethoden zugeführt werden.

Um den nach der Zentrifugation die Tumorzellen enthaltenden Zellring an der Interphase zwischen Zellseparationsmedium und Körperflüssigkeit für die Entnahme aus dem Zentrifugationsgefäß besser sichtbar zu machen, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dem Zellseparationsmedium einen Farbstoff zuzugeben. Beispielsweise können zu 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung 80 µl einer 5% Trypan Blau-Lösung zugegeben werden.

Bei Verwendung eines Zentrifugationsgefäßes mit poröser Barriere wird nach Entnahme der überstehenden Restflüssigkeit oberhalb der Interphase jedoch bevorzugt nicht nur die Interphase sondern die gesamte verbliebene Flüssigkeit oberhalb der porösen Barriere entnommen, nicht weil sich zwischen Interphase und poröser Barriere noch weitere Zellen befinden, sondern weil durch die Abnahme die im Zellring enthaltenen Zellen leicht durchmischt werden können. Um keine Zellen aus dem oberen Kompartiment zu verlieren wird dieses vorteilhaft noch zweimal mit Puffer (z.B. PBS) gewaschen.

Mit dem Anreicherungs-schritt können zirkulierende Tumorzellen und insbesondere zirkulierende Tumorzellen von soliden Tumoren, d.h. von nicht-hämatologischen Tumoren, angereichert werden oder hämatologische Tumorzellen, d.h. Tumorzellen des roten und weißen Blutsystems.

Mit dem Anreicherungsverfahren können Tumorzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte nahezu vollständig von den korpuskulären Bestandteilen von Körperflüssigkeiten wie z.B. den Zellen des roten und weißen Blutsystems getrennt, konzentriert und anschließend dem nächsten Schritt des erfindungsgemäßen Quantifizierungsverfahrens zugeführt werden.

Das beschriebene Anreicherungsverfahren bietet den Vorteil, daß Telomerase-positive hämatopoetische Zellen einfach und sicher von den anzureichernden Tumorzellen abgetrennt werden, so daß im anschließenden Quantifizierungsschritt keine falsch-positiven Ergebnisse durch Telomerase-aktive nicht-Tumorzellen erhalten werden. Darüber hinaus sind nur wenige Arbeitsschritte für die Anreicherung und Isolierung der Tumorzellen aus Körpergewebe notwendig, so daß dadurch die Prozessierung von größeren Mengen von Probenmaterial möglich wird. Die Kosten für die notwendigen Materialien sind beispielsweise gegenüber der Verwendung spezifischer

Antikörper und der anschließenden Trennung mittels geeigneter Apparaturen signifikant geringer.

Darüber hinaus zeigte die Untersuchung von 10 unterschiedlichen Zelllinien, die von Tumorgewebe, wie Melanom, Prostata-, Brust-, Lungen-, Leber- und Colorektalkarzinomen abgeleitet waren, daß die Zellen all dieser Zelllinien in ihrer Mehrzahl durch das beschriebene Anreicherungsverfahren angereichert wurden.

In einer alternativen Vorgehensweise zur Auftrennung der Blutzellen in Ficoll oder Percoll können die in der Probe enthaltenen Zellen, unter Konditionen kultiviert werden, die für kontaminierende Telomerase-positive Nicht-Tumorzellen ungünstig, jedoch für die vorhandenen Tumorzellen günstig sind. Das Resultat dieser Kultivierungsverfahren ist, daß kontaminierende Telomerase-positive Nicht-Tumorzellen absterben während vorhandene Tumorzellen überleben.

Hierfür kann zur Optimierung der Zellkultur, um die Proliferation der Tumorzellen einerseits und den Eintritt der Blutzellen in die G_0/G_1 -Phase bzw. deren Apoptose andererseits zu favorisieren, um vorhandene metastasierende Tumorzellen anzureichern, die Probe folgenden Bedingungen ausgesetzt werden:

Auswahl geeigneter Kulturmedien unter Verwendung (autologer) Seren,
Dauer der Kultivierung,
Auswahl des optimalen Sauerstoff-/Kohlendioxidgehalts,
Zugabe von Tumor-Zell-/Epithelzell-spezifischen Wachstumsfaktoren (Bsp. EGF etc.) oder
Auswahl einer geeigneten Oberflächen-Beschichtung, um die Adhärenz der Tumorzellen in Zellkulturbehältern zu erhöhen

und Selektion von adhärennten Zellen gegenüber Suspensionszellen.

Die Kultivierung kann somit beispielsweise wie folgt ausgeführt werden:

Die in der Probe enthaltenen Zellen können gesamt oder in Aliquoten (z.B. auf Mikrotiterplatten) mit oder ohne Zusätze in Kultur genommen werden. Diese Kulturen können in Folge Einflüssen ausgesetzt werden, die Nicht-Tumorzellen absterben, jedoch Tumorzellen überleben lassen. Die Einflüsse können beispielsweise allein schon die Dauer der Kultivierung, interne (z.B. Anstieg oder Abnahme des pH-Wertes im Kulturmedium) oder externe Einflüsse (wie z.B. Erhöhung oder Erniedrigung von pCO_2 oder pO_2) sein. Unsere Untersuchungen haben z.B. gezeigt, daß schon bei einer einfachen Kultivierung von Vollblut bei 37°C für 5 Tage, die mRNA kodierend für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (hTERT) zwischen Tag 1 und Tag 2 nicht mehr nachweisbar war. Noch nachzuweisen waren hingegen die mRNA für den T-Zell-Rezeptor (TCR) (3 Tage) und β -Aktin (5 Tage) (vgl. Abb. 4).

Die Kultivierung der in den Flüssigkeiten enthaltenen Nicht-Tumorzellen und Tumorzellen nach den oben genannten Verfahren kann auch zusätzlich sowohl vor als auch nach Separation der Zellen aus der Körperflüssigkeit (z.B. nach Gradientenzentrifugation z.B. mit Fiquoll-Hypaque) erfolgen.

Allein oder in Verbindung mit den oben beschriebenen Reinigungs- bzw. Kultivierungsverfahren ist es auch besonders vorteilhaft die Menge an für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierender mRNA aus venösem Blut mit der Menge an für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierender mRNA aus arteriellem Blut zu vergleichen, da bei

venöser Blutabnahme zum Zwecke der Tumorzellbestimmung etwa nur 20% aller Zellen gegenüber 100% der Zellen bei arterieller Blutabnahme nachweisbar sind [Koop, S. et al. (1995) Cancer Res. 55, 2520-2523]. Ebenso eignet sich ein Vergleich von Blut aus der Fingerkuppe mit venösem oder arteriellem Blut.

Die quantitative Bestimmung der für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierenden mRNA in der Probe ermöglicht es, zu bestimmen, ob Tumorzellen, insbesondere Metastasen, vor allem Mikrometastasen, von malignen Tumoren in der Körperflüssigkeit enthalten sind und in welcher Menge. Dies ist insbesondere für die frühzeitige klinische Diagnose der Metastasenbildung von malignen Tumoren und für die Überwachung einer Tumorthherapie von großem Nutzen. Als Tumorzellen können mit der vorliegenden Erfindung insbesondere Tumorzellen von Metastasen, vorzugsweise Mikrometastasen, von malignen Tumoren, vor allem Zellen metastasierender Tumore und/oder Neoplasien nachgewiesen werden, die beispielsweise von einem T-Zell-Lymphoblastom, T-Zell-Leukämiezellen, chronisch myeloische Leukämiezellen, akute lymphatische Leukämiezellen, chronisch lymphatische Leukämiezellen, Teratokarzinom, Melanom, Lungenkarzinom, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Leberzellkarzinom, Nierentumor, Nebennierentumor, Prostatakarzinom, Neuroblastom, Gehirntumor, kleines Lungenzellkarzinom, Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom und/oder Lymphom abstammen.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind die Oligonukleotid-Primer mit der Sequenz

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können;

sowie ein Oligonukleotid mit der Sequenz

5' CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC 3' (hTRT o)

als Oligonukleotid-Sonde und die entsprechende reverse komplementäre Sequenz des Oligonukleotids zum Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, beispielsweise Blut, Urin aber auch Stuhl, Exsudate oder Transudate von Körperhöhlen, insbesondere peripheres Blut, enthaltend

(a) ein Oligonukleotid-Primerpaar zur spezifischen Amplifizierung von Telomerase-kodierender Nukleinsäure, wobei das Oligonukleotid-Primerpaar vorzugsweise folgende Sequenzen aufweist:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können.

Der erfindungsgemäße Kit umfaßt in einer weiteren Ausführungsform zusätzlich (b) eine Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren zur Co-Amplifikation, wobei vorzugsweise 3 RNA-Standard-Nukleinsäuren zur Co-Amplifikation enthalten sind.

Der erfindungsgemäße Kit kann auch zusätzlich, wie oben näher beschrieben, ein markiertes Oligonukleotid als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten cDNA der Wildtypsequenz und/oder mehrere

markierte Oligonukleotide als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten cDNA der Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren enthalten. Darüber hinaus kann ein erfindungsgemäßer Kit für die PCR-Amplifikation zusätzlich die oben näher beschriebenen Enzyme, gegebenenfalls markierte Nukleotide und/oder geeignete Puffer enthalten, wie z. B. eine reverse Transkriptase, vorzugsweise eine AMV reverse Transkriptase, eine DNA-Polymerase, vorzugsweise eine Taq-Polymerase und/oder eine DNase und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel, wie oben bereits näher beschrieben.

Ein anderer erfindungsgemäßer Kit für die NASBA-Amplifikation kann ebenso neben den oben näher beschriebenen Standard-Nukleinsäuren ein markiertes Oligonukleotid als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA der Wildtypsequenz und/oder mehrere markierte Oligonukleotide als Hybridisierungsprobe zum spezifischen Nachweis der amplifizierten "antisense" RNA der Standard-Nukleinsäure bzw. -Nukleinsäuren enthalten. Zusätzlich kann er ebenso die oben näher beschriebenen Enzyme, gegebenenfalls markierte Nukleotide und/oder geeignete Puffer, wie z. B. eine reverse Transkriptase, vorzugsweise eine AMV reverse Transkriptase, eine RNA-Polymerase, vorzugsweise eine T7 RNA-Polymerase, eine RNase H und/oder eine DNase enthalten, und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel, wie oben bereits näher beschrieben.

Die folgenden Beispiele und Figuren sollen die vorliegende Erfindung näher beschreiben, ohne sie jedoch darauf zu beschränken.

Beschreibung der Figuren

Abb. 1 zeigt die von Nakamura et al. beschriebene Sequenz, kodierend für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase, von 4015 Basenpaaren (bp) und die Position der entworfenen Oligonukleotid-Primer bzw. die Oligonukleotid-Sonde (hTERT o) (unterstrichen): 5'-Primer hTERT1 (Position 1780-1813), 3'-Primer hTERT2 (Position 2261-2290) mit einem Amplifikationsprodukt von 513 Basenpaaren (bp) und die Sonde hTERT o (Position 1964-1987).

Abb. 2 zeigt (A) eine schematische Darstellung der genomischen Organisation der menschlichen Telomerase (hTERT). Das Telomerase-Protein weist eine Telomerase-spezifische Region auf (T, schwarz markiert) und besitzt Homologien zu konservierten Regionen von Reversen Transkriptasen verschiedener Viren (1, 2 und A bis E, schraffiert). Das verwendete Primerpaar (hTERT1, hTERT2) ist durch Pfeile dargestellt und ist in einer Region lokalisiert, die keine Homologien mit viralen Reversen Transkriptasen aufweist. (B) zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese einer RT-PCR-Amplifikation mit hTERT-spezifischen Primern an RNA der humanen Teratokarzinom-Zelllinie Tera2. Bande M: Marker, Bande 1 RT-PCR-Amplifikation, Bande 2: entsprechende DNA-Kontrolle ohne Reverse Transkriptase Reaktion.

Abb. 3 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese (a) der RT-PCR-Produkte mit TCR-spezifischen Primern an RNA und DNA von humanen PBMC und der humanen Fibroblasten-Zelllinie MRC5 und die entsprechende Southern-Blot-Analyse mit einer TCR-spezifischen Oligonukleotid-Sonde (TCR-Sonde). M: Marker.

Abb. 4 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte mit spezifischen Primern für hTERT (A) bzw. TCR und Aktin (B) an aus 1 ml Vollblut isolierter RNA, nach 0-5 Tagen

34

Kultur sowie eine Reaktion an der RNA der humanen Teratokarzinom-Zelllinie Tera2. Banden 0^d-5^d: Zeitraum der Kultur von respektive 0 bis 5 Tagen. M: Marker, Tera2: humane Teratokarzinom-Zelllinie Tera2.

Abb. 5 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte an RNA der Prostata-Karzinom Zelllinie LNCap. Banden 10³-10⁻²: Verwendete Zellzahl pro Ansatz. DNA: DNA Kontrolle. H₂O: Wasser Kontrolle. M: Marker. Die PCR wurde, wie in Abb. 7 angegeben mit spezifischen Primern (Abb. 6) für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase (A) und β -Aktin, mit 40 Zyklen durchgeführt. Unter den beschriebenen RT-PCR-Bedingungen ist die für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase kodierende mRNA in bis zu 10 Zellen nachweisbar (Pfeil). Zum Ausschluß von DNA-Kontaminationen wurde RNA von 10³ Zellen ohne Reverse Transkriptase als Kontrollreaktion sowie eine Wasser-Kontrolle (H₂O) in der RT-PCR mitgeführt.

Abb. 6 zeigt die Sequenzen der vorliegend eingesetzten Oligonukleotide.

Abb. 7 zeigt ein Flußdiagramm für das erfindungsgemäße Verfahren.

Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut eines gesunden Spenders (A) und Blut des gleichen Spenders gemischt mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-Zelllinie T289 (B, C) nach Tumorzellenanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml.

Abb. 9 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut gesunder Spender, das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom- (A) und Mamma-Karzinom-Zelllinie (B) gemischt wurde, nach Tumorzellenanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml.

Abb. 10 zeigt die Wiederfindungsrate von GFP-transfizierten Melanomzellen, die zu Blut unterschiedlicher (A, B) gesunder Spender gemischt wurden, nach Anreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml.

BEISPIELE

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die folgenden Beispiele nach Standardverfahren, wie z. B. bei Sambrook, J. et al. (1989) supra beschrieben, oder nach den Herstellerangaben der verwendeten Kits bzw. Enzyme durchgeführt.

1. Tumorzellanreicherung

1.1 Allgemeines Vorgehen

In einem silikonisierten Kunststoff-Zentrifugationsgefäß wurde venöses Blut (5-20 ml), mit EDTA versetzt (3,9 mM Endkonzentration, pH 8,0) und mit 1 Volumen PBS gemischt. Das Blut/PBS-Gemisch wurde anschließend auf 5-10 ml Percoll mit einer Dichte von 1,065 g/ml gegeben und bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremse für 30 min. bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes wurde anschließend für 5-10 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Dadurch wurde während des Absaugens der Zellen, die sich an der Interphase im Übergang zwischen dem Percoll und dem darüberliegenden Plasma/PBS-Gemisch befanden, eine Kontamination mit Zellen des Pellets verhindert. Die Zellen der Interphase, bei denen es sich vorwiegend um Thrombozyten und um im Blut zirkulierende Tumorzellen handelte, wurden anschließend in ein neues silikonisiertes Kunststoff-Zentrifugationsgefäß übertragen und für 10 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende RT-PCR-Untersuchung wurde das Zellpellet in einem Guanidinium-Isothiocyanat-Puffer aufgenommen, wodurch die

Zellen lysiert wurden und einer RNA-Isolierung unterzogen werden konnten.

1.2 Spiking-Experiment

Mit Hilfe von sogenannten Spiking-Experimenten, bei denen Tumorzellen verschiedener Zelllinien zum Blut normaler Spender gemischt wurden und die Tumorzellen anschließend re-isoliert und in der RT-PCR untersucht wurden, wurde gezeigt, daß in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie die Telomerase-Aktivität von etwa 1-4 gespikter Tumorzellen/ml Blut nachgewiesen werden kann.

Hierzu wurden die Zellen der zu spikenden Tumorzelllinien entsprechend der Angaben des Herstellers (ATCC, *American Tissue Cell Culture*) bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend trypsiniert und in Medium (RPMI 1640) gewaschen. Nach Entnahme eines 10 µl Aliquots, das 1:1 mit Tryptan-Blau gemischt wurde, wurden die lebenden Zellen in einer Zählkammer bestimmt und die entsprechende Zellkonzentration wurde berechnet. Anschließend wurde die Zellsuspension verdünnt und ein Volumen, das einer bestimmten Zellzahl entspricht, mit dem Blut gesunder Blutspender gemischt. Als Kontrolle diente Blut dem keine Tumorzellen zugesetzt wurden. Die Anreicherung der gespikten Tumorzellen wurde einmal zum Vergleich mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden anschließend mikroskopische, durchflußzytometrische und RT-PCR-Analysen durchgeführt.

a) Vergleichsversuch

Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von 20 ml Blut eines gesunden Spenders (A) und 20 ml Blut des gleichen Spenders gemischt mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-

Zelllinie T289 (B, C). Das Blut wurde auf Percoll einer Dichte von 1,070 g/ml geschichtet, zentrifugiert und anschließend wurden die Zellen analysiert. Die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTRT) ist im normalen Blut nicht nachweisbar (A), während bei 1 und 2 gespikten Melanomzellen pro ml Blut hTRT nachweisbar ist (B, C). Bei der verwendeten Percoll-Dichte von 1,070 g/ml sind jedoch noch hinreichend viele Telomerase-aktive Leukozyten in der Interphase vorhanden, wodurch die RNA-Komponente (hTR) auch im ungespikten Blut nachweisbar ist. Für die Präsenz von aktivierten und wahrscheinlich deshalb auch Telomerase-aktiven Leukozyten in der Fraktion der isolierten Zellen spricht auch die Tatsache, daß CD69, ein früher Aktivierungsmarker in B- und T-Zellen, in allen Blutproben nachweisbar ist (A-C). Der Tumormarker CEA (Carcinoembrionic Antigene) ist sowohl im ungespikten als auch im gespikten Blut negativ (A-C). GFP (Green Fluorescent Protein), der als zusätzlicher Marker für die gespikten Tumorzellen verwendet wurde, ist im ungespikten Blut nicht nachweisbar (A). Da nur etwa 50% der transfizierten T289-Melanomzellen GFP exprimieren, ist das Protein nur in bis zu 2 gespikten Tumorzellen pro ml Blut nachweisbar (B). Aktin diente als RT-PCR-Positivkontrolle (Aktin) und im Ansatz ohne RT-Reaktion als Negativkontrolle (Aktin ØRT). Die PCR-Amplifikation genomischer DNA untransfizierter T289-Zellen führt mit den spezifischen Primerpaaren für hTRT, GFP und CD69 zu keinen Amplifikaten.

b) erfindungsgemäßer Versuch

Abb. 9 zeigt RT-PCR-Analysen von Blut gesunder Spender das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom- (A) und Mamma-Karzinom-Zelllinie (B) gemischt, auf Percoll einer Dichte von 1,065 g/ml geschichtet, zentrifugiert und anschließend analysiert wurde. Die RNA-Komponente der Telomerase (hTR) ist im Unterschied zu der Verwendung von Percoll mit einer Dichte

von 1,070 g/ml im ungespikten Blut nicht nachweisbar (vgl. Fig. 1). In den Proben mit 2 gespikten Prostata-Karzinomzellen (A) bzw. mit 4 gespikten Mamma-Karzinomzellen (B) pro ml Blut kann hTR nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil). Im Unterschied zur Melanom-Zelllinie T289 konnte bei diesen Tumorzellen keine (A) bzw. erst bei 10^4 Tumorzellen (B) eine Expression der katalytischen Untereinheit (hTRT) nachgewiesen werden. Weder der Prostatazell-spezifische Marker PSA (Prostate Specific Antigene) noch der Epithelzell-spezifische Marker CK20 (Cytokeratin 20) ist in den entsprechenden Tumorzellen nachweisbar. Aktin dient als RT-PCR-Positivkontrolle.

Abb. 10 zeigt die Wiederfindungsraten von GFP-transfizierten Melanomzellen (T289), die zu Blutproben gesunder Spender gemischt (gespikt) wurden. Die gespikten Blutproben wurden anschließend auf Percoll einer Dichte von 1,065 g/ml geschichtet, zentrifugiert und die Anzahl der re-isolierten Tumorzellen (Wiederfindung) wurde mikroskopisch (-●-) und/oder durchflußzytometrisch (-▲-) bestimmt. Da nur etwa 75% für Probe A bzw. 50% für Probe B der GFP-transfizierten T289-Zellen im Durchflußzytometer nachweisbar waren, wurden die Wiederfindungsraten entsprechend korrigiert. Die Wiederfindungsrate gespikter Tumorzellen ist abhängig vom jeweiligen Blutspender (die Blutproben von A) und B) stammen von unterschiedlichen Spendern), der verwendeten Zelllinie und verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der gespikten Tumorzellen. Möglicherweise führt eine Abstoßungs-Reaktion der entsprechenden hämatopoetischen Zellen zur Lyse, Aggregation und schließlich zum Verlust der gespikten allogenen Tumorzellen. B) zeigt darüber hinaus, daß die Anzahl der tatsächlich gespikten Tumorzellen (-■-) zwischen 6% - 37% geringer ist als die theoretisch berechnete Anzahl gespikter Tumorzellen (-◆-).

Unter Hinzunahme hier nicht dargestellter Untersuchungen mit Lungen- und Mamma-Karzinomzellen ergibt sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate mit der erfindungsgemäß bevorzugten Anreicherungsmethode von $46\% \pm 20\%$ für 4-512 gespikte Zellen ($n=16$) und für ≤ 50 gespikte Zellen von $54\% \pm 20\%$ ($n=15$).

Damit liegt die Wiederfindungsrate des erfindungsgemäß bevorzugten Tumorzellenanreicherungsverfahrens etwa im Bereich von magnetischen Zell-Separatoren wie MACS für die eine Wiederfindungsrate von etwa 30-58% angegeben wird.

2. Kultivierung und Isolierung von peripherem Blut, Gewebe und Zellen für die nachfolgenden Beispiele

Tumorzelllinien wie die menschliche Prostata-Karzinom-Zelllinie LNCap und die Teratokarzinom Zell-Linie Tera 2 wurden gemäß den Vorgaben der ATCC (American Tissue Culture Collection), in Kultur genommen. Venöses Spenderblut von gesunden Kontrollpersonen wurde mittels Punktion einer Unterarmvene in EDTA-Monovetten® (Saarsted) abgenommen.

3. Isolierung von zellulärer RNA

Die Isolierung von totaler zellulärer RNA erfolgte nach Standardverfahren [Chomczynski et al. (1987) Anal Biochem 162, 156; Sambrook, J. et al. (1989). Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Peripheres Blut wurde wie in Abb. 7 gezeigt sofort nach Abnahme in RNA-Lysispuffer (4 M Guanidinium Isothiocyanat; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1% Mercaptoethanol) überführt und homogenisiert. Die Gemische wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert.

4. Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem GeneAmp[®] RNA-PCR-Kit (Perkin Elmer) nach Vorgaben des Herstellers wie in Abb. 7 gezeigt durchgeführt. Aliquote der isolierten totalen RNA von peripherem Blut und Zelllinien wurden jeweils zuvor mit 4U DNase und 40U RNase Inhibitor (Boehringer, Mannheim) in 36 µl Ansätzen (in 100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂, 1mM dNTP-Mix und 2,5 mM Random Hexamers) bei 37°C für 30 Minuten und bei 75°C für 10 Minuten hydrolysiert und anschließend die DNase für 10 Minuten bei 90°C inaktiviert und dann das Reaktionsgemisch sofort auf Eis gegeben.

Die beiden Oligonukleotid-Primer:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2)

wurden nach der von Nakamura et al. veröffentlichten Sequenz, kodierend für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (Nakamura et al. (1997). Science 277: 955-9) entworfen (Abb. 1) und mit einem Applied Biosystem 380A Synthesizer synthetisiert. Die Spezifität der hTRT1- und hTRT2-Primer wurde mittels Computer gestützter Homologieanalyse an den Nukleinsäuresequenzen in den GenBank-, EMBL-, DDBJ- und PDB-Datenbanken mittels BLASTN 1.4.9 MP [Altschul, S. F. et al. (1990). J Mol Biol 215: 403-410] überprüft.

Zur Abstimmung der Amplifikationsmengen wurden für jedes Experiment gleiche RNA-Mengen für die RT-Reaktion eingesetzt. Um eine Kontamination der RNA Präparationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde jede mit DNase hydrolysierte RNA-haltige Probe zuerst der unten beschriebenen PCR unterzogen

und auf Amplifikation hin überprüft. Die RNA-haltige Probe, bei der kein Amplifikationsprodukt nachweisbar war, wurde für die folgenden cDNA-Synthese- und PCR-Schritte eingesetzt. Als interne Standardkontrolle wurden Oligonukleotid-Primer für β -Aktin und den TCR eingesetzt (Abb. 6). Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde an 18 μ l des DNase Verdaues unter Zugabe von 50U MuLV Reverser Transkriptase und 40U RNase Inhibitor bei 42°C für 30 Minuten durchgeführt und die Reaktion bei 99°C für 5 Minuten abgebrochen. In den Negativkontrollen wurden statt der Enzyme 4 μ l Wasser zugesetzt.

Die PCR wurde wie in Abb. 7 gezeigt an 5 μ l der cDNA-Reaktion nach folgendem Programm durchgeführt: (97°C: 15 Sekunden vorwärmen); (97°C: 15 Sekunden, 70°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 10 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 65°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 20 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 50°C: 30 Sekunden 72°C: 30 Sekunden [plus 15 Sekunden Extension pro Zyklus], 10 Zyklen; (72°C: 7 Minuten, finale Extension).

Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch auf 1.5%igem TAE Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht visualisiert und fotodokumentiert (siehe Abb. 2-5).

5. Herstellung möglicher RNA-Standard-Nukleinsäuren (hTRTKa, hTRTKb und hTRTKc)

Die zur Klonierung bestimmten PCR-Amplifikationsprodukte können gelelektrophoretisch auf 1.5% TAE Agarose aufgetrennt und eluiert (Qiagen) werden. Die Aufreinigung der Restriktionshydrolysate kann durch Phenol-Chlorophorm-Extraktion und Fällung in Salz und Ethanol oder durch DNS-Reinigung (Qiagen) geschehen. Die Konstrukte können, z.B.

durch Ligierung der Fragmente in die korrespondierenden Schnittstellen eines Klonierungs- und Transkriptionsvektors, z.B. pGEM-13Zf(+), mit Hilfe der T4 Ligase geschaffen werden. Dieser Vektor erlaubt die in vitro Transkription von klonierten Fragmenten durch den wahlweisen Einsatz von Sp6- oder T7 RNA Polymerasen. Kompetente Bakterien (XL-1Blue, Stratagen) werden mittels Elektroporation (BioRad) transformiert. Plasmid DNA wird mittels Plasmid Reinigungs Kits (Qiagen) gereinigt. Positive Klone werden, unter Verwendung von vektor- oder sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primern, mit der PCR validiert. Eine Sequenzvalidierung der Konstrukte kann durch semiautomatische Sequenzanalyse erfolgen.

Das Konstrukt pGEM-hTRT wird als Ausgangskonstrukt für die Konstrukte pGEM-hTRT(Ka) pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) geschaffen. pGEM-hTRT(Ka), pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) unterscheiden sich von pGEM-hTRT und untereinander durch einen randomisierten Sequenzaustausch von ca. 20 Basen Paaren (bp). Die Konstrukte werden zur in vitro Transkription mit Sp6 RNA Polymerase der Standard-RNA: hTRT(Ka), hTRT(Kb) und hTRT(Kc), verwendet. Zur Bildung des Konstrukts pGEM-hTRT wird die cDNA der katalytischen Untereinheit der menschlichen Telomerase (Abb. 1) z.B. in die NotI und HindIII-Schnittstellen von pGEM-13Zf(+) kloniert. Dies wird dadurch erreicht, daß mit diese Schnittstellen enthaltenen Oligonukleotid-Primern die aus der Sequenz hTRT (Abb. 1) abgeleitet werden, eine RT-PCR an der bereits gewonnenen RNA aus Tumorzellen oder -linien unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt wird. Damit kann z.B. die mit vorgegebenen Schnittstellen versehene Voll-Längen hTRT oder ein kürzeres Fragment amplifiziert werden. Nach einer Restriktionshydrolyse mit spezifischen Restriktionsenzymen z.B. wie NotI und HindIII, wird das entstandene Fragment in die korrespondierenden Schnittstellen (z.B. Position 12 bzw.

38) von pGEM-13Zf(+) kloniert und das Konstrukt pGEM-hTRT geschaffen. Die Konstruktion von pGEM-hTRT(Ka) wird dadurch erreicht, daß im Konstrukt pGEM-hTRT eine ca. 20bp Sequenz erreicht, daß im Konstrukt pGEM-hTRT eine ca. 20bp Sequenz mit einer ca. 20bp Kassette ausgetauscht wird. Dieser Austausch wird durch rekombinante PCR durchgeführt und ist eine Abwandlung der von Higuchi et al. beschriebenen Verfahren [Higuchi, R. (1988). Nucleic Acid Res 16: 7351-7367; Higuchi, R. (1990). M. Innis A. et al. eds. San Diego, New York, Berkley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press, Inc. 177-183]. In einem ersten Schritt werden zwei unabhängige PCR-Reaktionen an pGEM-hTRT durchgeführt: Das Amplifikat aus der 1. PCR-Reaktion ergibt das 5'-Fragment und wird mit geeigneten Restriktionsenzymen zu einem 5'-Fragment verdaut. Das Amplifikat aus der 2. PCR-Reaktion ergibt das 3'-Fragment und wird mit geeigneten Restriktionsenzymen zu einem 3'-Fragment hydrolysiert. Mit T4 Ligase werden die Schnittstellen der 5'- und 3'-Fragmente miteinander zu einem Fragment verbunden, in die korrespondierenden Schnittstellen von pGEM-13Zf(+) kloniert und das Konstrukt pGEM-hTRT(Ka) geschaffen. Die Konstruktion von pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) wird dadurch erreicht, daß die oben geschaffene ca. 20bp Sequenz im Konstrukt pGEM-hTRT(Ka) jeweils mit einer randomisierten Sequenz von ca. 20bp ausgetauscht wird. In vitro RNA kann dann mit Sp6 RNA Polymerase von pGEM-hTRT(Ka), pGEM-hTRT(Kb) und pGEM-hTRT(Kc) geschaffen werden. Die spezifischen RNAs können dann mit zu o.a. ca. 20bp-Austauschsequenzen bzw. zu der Wildtypsequenz (wt) komplementären Oligonukleotiden O(Ka), O(Kb), O(Kc) und O(wt), nachgewiesen werden. Die weitere Aufbereitung der RNA, wie DNase Verdau, Reinigung und Kalibrierung erfolgt nach Standardmethoden.

6. Ergebnisse

Die Untersuchungen an Tumorzelllinien ergaben, daß die für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase kodierende mRNA in unterschiedlichen Mengen in Tumorzelllinien bei gleicher Amplifikationsmenge der TCR-, bzw. β -Actin-Kontrollreaktion nachweisbar war (Abb. 2, 4 und 5). Eine Kontamination mit genomischer DNA konnte durch eine Kontrollreaktion ohne Zugabe von reverser Transkriptase jeweils ausgeschlossen werden.

In vergleichenden Untersuchungen, bei unterschiedlich langen Kultivierungen von Vollblut konnte eindeutig gezeigt werden, daß nach 1 - 5 Tagen Kultur des Vollblutes kein spezifisches RT-PCR Produkt der katalytischen Untereinheit der menschlichen Telomerase mehr detektierbar war. Parallel dazu nahm mit zunehmender Dauer der Kultur die Menge an spezifischer TCR- und Aktin-RNA sehr viel langsamer ab. Das Resultat dieser Kultivierungsuntersuchungen ist, daß offensichtlich kontaminierende Telomerase-positive Nicht-Tumorzellen schon zwischen Tag 0 und Tag 1 abgestorben sind.

Weiterhin ist unter den beschriebenen RT-PCR-Bedingungen an unterschiedlichen Mengen von Telomerase-positiven Tumorzellen, die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase in bis zu 10 Zellen nachweisbar.

Da im Unterschied zum TRAP-Assay in der erfindungsgemäß eingesetzten Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Methode hoch-aufgereinigte RNA zur Amplifikation verwendet wird, kann eine Inhibierung der Taq-Polymerase weitgehend ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte für die beschriebene RT-PCR-Methode eine Sensitivität für den Nachweis der RNA-Komponente (hTR) sowie der katalytischen Untereinheit (hTRT) der Telomerase von etwa 1 Zelle pro RT-

PCR-Ansatz gezeigt werden. Damit bietet die Verwendung der beschriebenen RT-PCR-Methode eine vergleichbare oder höhere Sensitivität des Nachweises von Telomerase-aktiven Tumorzellen. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß der Nachweis der hTR- und der hTERT-Expression mit der katalytischen Aktivität der Telomerase korreliert (K. Yashima et al., J. Clin. Pathol. (1997), 50, 110-7).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, dadurch gekennzeichnet, daß
 - (a) die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den an- oder abgereicherten Tumorzellen
 - (b) eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert wird, und
 - (c) die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Amplifizierungsreaktion mit der zu untersuchenden Probe eine reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt wird, bei der die in der Probe enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit der zu untersuchenden Probe vor der Umschreibung der mRNA in cDNA eine DNase-Reaktion durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Probe vorzugsweise über eine Ionenaustausch-Chromatographie, insbesondere über Kieselgel gereinigt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß zur quantitativen Bestimmung der Telomerase-kodierenden Nukleinsäure die Amplifikationsprodukte bereits während der Amplifizierung markiert werden, und die Kinetik der Amplifikation

kontinuierlich schon während des Amplifikationsvorgangs gemessen wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß während der Amplifikation eine für die Amplifikationsprodukte spezifische Sonde vorliegt, die ein für die pro Synthesekyklus amplifizierten Produkte proportionales, charakteristisches Signal aussendet.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß zur quantitativen Bestimmung der Telomerase-kodierenden Nukleinsäure mindestens eine, vorzugsweise drei Standard-Nukleinsäuren co-amplifiziert werden, die in unterschiedlichen Konzentrationen zu der zu untersuchenden Probe dazugegeben werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifizierungsprodukt entweder direkt oder über eine Markierung vorzugsweise über eine radioaktive Markierung, eine Biotin-Markierung, eine Fluoreszenz-Markierung oder eine Elektrochemolumineszenz-Markierung quantifiziert wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifizierungsprodukt über eine Hybridisierung mit einem markierten Oligonukleotid nachgewiesen wird, wobei die Markierung vorzugsweise eine radioaktive Markierung, eine Biotin-Markierung, eine Fluoreszenz-Markierung oder eine Elektrochemolumineszenz-Markierung ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7-9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Quantifizierung der zu bestimmenden Telomerase-kodierenden Nukleinsäure die Menge der co-

amplifizierten Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren mit der Menge der Telomerase-kodierenden Nukleinsäure verglichen wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um peripheres Blut handelt, und daß als positive Kontrolle mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion durchgeführt wird, bei der eine im peripheren Blut vorkommende Nukleinsäure, vorzugsweise die mRNA kodierend für β -Globin, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, β -Aktin oder den T-Zell-Rezeptor, spezifisch amplifiziert und nachgewiesen wird.

12. Verfahren nach Anspruch 1 oder nach einem der Ansprüche 3-11, dadurch gekennzeichnet, daß als negative Kontrollen vor der Amplifizierungsreaktion mit der zu untersuchenden Probe keine reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt wird und/oder anstelle der Körperflüssigkeit Wasser eingesetzt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Amplifizierung folgende Oligonukleotid-Primer verwendet werden:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthält.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, durch gekennzeichnet, daß zur Amplifizierung eine DNA-Polymerase oder eine RNA-Polymerase verwendet wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle der Amplifizierung mit der DNA-

Polymerase die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und im Falle der Amplifizierung mit der RNA-Polymerase die isothermale Nukleinsäuresequenz-basierende Amplifikation (NASBA) durchgeführt wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß aus der zu untersuchenden Blutprobe Stammzellen und/oder aktivierte Immunzellen vorzugsweise mittels Immunabsorption angereichert werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß aus der zu untersuchenden Blutprobe die Tumorzellen vorzugsweise mittels Immunabsorption angereichert werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Probe enthaltenen Zellen unter Konditionen kultiviert werden, die für Telomerase-positive Nicht-Tumorzellen ungünstig, jedoch für vorhandene Tumorzellen günstig sind.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Dauer der Kultivierung so bemessen ist, daß Nicht-Tumorzellen absterben und Tumorzellen überleben.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-19, worin zur Anreicherung der Tumorzellen ein Zellseparationsmedium mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,055 bis < 1,070 g/ml aufweist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,060-1,067 g/ml und bevorzugt von etwa 1,065 g/ml aufweist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation bei ca. 1.000 x g über ca. 30 Minuten durchgeführt wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-22, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium Percoll oder Ficoll ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-23, dadurch gekennzeichnet, daß der Körperflüssigkeit vor dem Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben werden, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern, und/oder die Körperflüssigkeit vor dem Überschichten von Substanzen befreit wird, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-24, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit peripheres Blut ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut in einer gerinnungshemmenden Substanz abgenommen und vor dem Überschichten des Zellseparationsmediums mit einem Verdünnungsmedium bevorzugt im Verhältnis von ca. 1:1 verdünnt wird.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut venöses oder arterielles Blut ist.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-24, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit ausgewählt ist aus Lymphe, Urin, Exsudaten, Transudaten, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen

oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertem Körpergewebe.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-28, dadurch gekennzeichnet, daß das Zentrifugationsgefäß nach der Zentrifugation und vor der Abnahme der an Tumorzellen angereicherten Interphase stark abgekühlt wird, um ein Vermischen der Zellen in den verschiedenen Schichten zu verhindern.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt wird, das durch eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellsuspensionsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweisen.

32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100 μm , vorzugsweise 20-30 μm aufweisen.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30-32, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb aus einem hydrophoben Material bestehen oder mit einem hydrophoben Material beschichtet sind.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 20-33, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium einen Farbstoff enthält, der das Zellseparationsmedium von der darüberliegenden Körperflüssigkeit farblich unterscheidbar

macht und dadurch die Lokalisation der Interphase vereinfacht.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-34, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß bei dem genannten Verfahren zum einen eine venöse Blutprobe und zum anderen eine arterielle Blutprobe untersucht wird und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-35, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zu untersuchenden Probe um Blut handelt, und daß bei dem genannten Verfahren zum einen eine Blutprobe aus der Fingerkuppe und zum anderen eine venöse oder arterielle Blutprobe untersucht wird und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-36, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen von Metastasen, vorzugsweise Mikrometastasen, maligner Tumore stammen.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-37, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen aus einer Gruppe von Zellen metastasierender Tumoren und/oder Neoplasien ausgewählt werden, die von einem T-Zell-Lymphoblastom, T-Zell-Leukämiezellen, chronisch myeloische Leukämiezellen, akute lymphatische Leukämiezellen, chronisch lymphatische Leukämiezellen, Teratokarzinom, Melanom, Lungenkarzinom, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Leberzellkarzinom, Nierentumor, Nebennierentumor, Prostatakarzinom, Neuroblastom, Gehirntumor, Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom und/oder Lymphom abstammen.

39. Oligonukleotid-Primer mit der Sequenz

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls zusätzlich eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthalten können.

40. Oligonukleotid-Sonde mit der Sequenz

5' CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC 3' (hTRT o)

und/oder die entsprechende reverse komplementäre Sequenz davon.

41. Kit zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, enthaltend:

(a) ein Oligonukleotid-Primerpaar zur spezifischen Amplifizierung von Telomerase-kodierender Nukleinsäure.

42. Kit nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid-Primerpaar gemäß (a) folgende Sequenzen hat:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und/oder
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2),

wobei hTRT1 und/oder hTRT2 gegebenenfalls eine Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase enthält.

43. Kit nach einem der Ansprüche 41 oder 42, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich (b) eine Standard-Nukleinsäure bzw. Standard-Nukleinsäuren zur Co-Amplifikation enthält.

44. Kit nach einem der Ansprüche 41-43, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich ein markiertes Oligonukleotid zum Nachweis der amplifizierten Nukleinsäure der zu bestimmenden Probe und/oder ein oder mehrere markierte Oligonukleotide zum Nachweis der co-amplifizierten Standard-Nukleinsäure bzw. Standard-Nukleinsäuren enthält, insbesondere ein Oligonukleotid mit der Sequenz:

5' CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC 3' (hTRT o)

und/oder die entsprechende reverse komplementäre Sequenz davon.

45. Kit nach einem der Ansprüche 41-44, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine reverse Transkriptase, eine DNA-Polymerase, vorzugsweise eine Taq-Polymerase, eine DNase und/oder geeignete Puffer und gegebenenfalls markierte Nukleotide und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel enthält.

46. Kit nach einem der Ansprüche 41-45, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine reverse Transkriptase, eine RNA-Polymerase, vorzugsweise eine T7 RNA-Polymerase, eine RNase H, eine DNase und/oder geeignete Puffer und gegebenenfalls markierte Nukleotide und gegebenenfalls zur Abreicherung von Stammzellen und/oder aktivierten Immunzellen und/oder zur Anreicherung von Tumorzellen geeignete Mittel enthält.

47. Kit nach einem der Ansprüche 41-46, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055 bis < 1,070 g/ml aufweist, umfaßt, sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.

55

48. Kit nach Anspruch 47, worin das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,060 bis 1,067 g/ml und vorzugsweise von etwa 1,065 g/ml aufweist.

49. Kit nach einem der Ansprüche 47 oder 48, worin das Zentrifugationsgefäß eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb mit einer Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweist, die das Zentrifugationsgefäß in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilen.

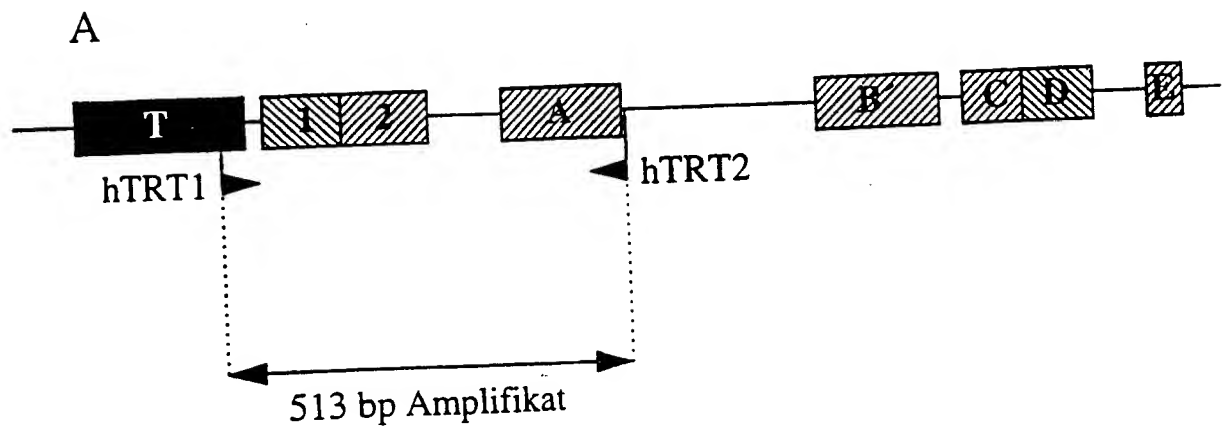
50. Kit nach Anspruch 49, worin die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100 μm , vorzugsweise 20-30 μm aufweisen.

51. Kit nach Anspruch 49 oder 50, worin sich das Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes befindet.

1	GCAGCGCTGC	GTCCTGCTGC	GCACGTGGGA	AGCCCTGGCC	CCGGCCACCC	CCGCGATGCC
61	GCGCGCTCCC	CGCTGCCGAG	CCGTGCGCTC	CCTGCTGCGC	AGCCACTACC	GCGAGGTGCT
121	GCCGCTGGCC	ACGTTCCGTGC	GGCGCCTGGG	GCCCCAGGGC	TGGCGGCTGG	TGCAGCGCGG
181	GGACCCGGCG	GCTTTCCGCG	CGCTGGTGGC	CCAGTGCCTG	GTGTGCGTGC	CCTGGGACGC
241	ACGGCCGGCC	CCCGCCGCCC	CCTCCTTCCG	CCAGGTGTCC	TGCTGAAGG	AGCTGGTGGC
301	CCGAGTGCTG	CAGAGGCTGT	GCGAGCGCGG	CGCGAAGAAC	GTGCTGGCCT	TCGGCTTCGC
361	GCTGCTGGAC	GGGGCCCGCG	GGGGCCCCCC	CGAGGCCCTT	ACCACCAGCG	TGCGCAGCTA
421	CCTGCCCAAC	ACGGTGACCG	ACGCACTGCG	GGGGAGCGGG	GCGTGGGGGG	TGCTGCTGCG
481	CCGCGTGGGC	GACGACGTGC	TGGTTACACT	GCTGGCACGC	TGCGCGCTCT	TTGTGCTGGT
541	GGCTCCCAGC	TGCGCCTACC	AGGTGTGCGG	GCCGCCGCTG	TACCAGCTCG	GCGCTGCCAC
601	TCAGGCCCCG	CCCCCGCCAC	ACGCTAGTGG	ACCCCGAAGG	CGTCTGGGAT	GCGAACGGGC
661	CTGGAACCAT	AGCGTCAGGG	AGGCCGGGGT	CCCCCTGGGC	CTGCCAGCCC	CGGGTGCAGG
721	GAGGCGCGGG	GGCAGTGCCA	GCCGAAGTCT	GCCGTTGCCC	AAGAGGCCCA	GGCGTGGCGC
781	TGCCCCCTGAG	CCGGAGCGGA	CGCCCCGTGG	GCAGGGGTCC	TGGGCCACCC	CGGGCAGGAC
841	GCGTGGAACG	AGTGACCGTG	GTTTCTGTGT	GGTGTCACTT	GCCAGACCCG	CCGAAGAAGC
901	CACCTCTTTG	GAGGGTGCAG	TCTCTGGCAC	GCGCCACTCC	CACCCATCCG	TGGGCCGCCA
961	GCACCACGCG	GGCCCCCAT	CCACATCGCG	GCCACCACGT	CCCTGGGACA	CGCCTTGTCC
1021	CCCGGTGTAC	GCCGAGACCA	AGCACTTCCT	CTACTCCTCA	GGCGACAAGG	AGCAGCTGCG
1081	CCCCCTCTTC	CTACTCAGCT	CTCTGAGGCC	CAGCCTGACT	GGCGCTCGGA	GGCTCGTGGA
1141	GACCATCTTT	CTGGGTTCCT	GGCCCTGGAT	GCCAGGGACT	CCCCGCAGGT	TGCCCCGCCT
1201	GCCCCAGCGC	TACTGGCAAA	TGCGGCCCTT	GTTTCTGGAG	CTGCTTGGGA	ACCACGCGCA
1261	GTGCCCCCTAC	GGGGTGCTCC	TCAAGACGCA	CTGCCCCGCT	CGAGCTGCGG	TCACCCACAG
1321	AGCCGGTGTC	TGTGCCCGGG	AGAAGCCCCA	GGGCTCTGTG	GCGGCCCCCG	AGGAGGAGGA
1381	CACAGACCCC	CGTCGCCCTG	TGCAGCTGCT	CCGCCAGCAC	AGCAGCCCCC	GGCAGGTGTA
1441	CGGCTTCGTG	CGGGCCTGCC	TGCGCCGGCT	GGTGCCCCCA	GGCCTCTGGG	GCTCCAGGCA
1501	CAACGAACGC	CGCTTCCTCA	GGAACACCAA	GAAGTTCATC	TCCCTGGGGA	AGCATGCCAA
1561	GCTCTCGCTG	CAGGAGCTGA	CGTGGAAGAT	GAGCGTGCGG	GAATGCGCTT	GGCTGCGCAG
1621	GAGCCCAGGG	GTGCGCTGTG	TTCCGGCCGC	AGAGCACCGT	CTGCGTGAGG	AGATCCTGGC
1681	CAAGTTCCCT	CACTGGCTGA	TGAGTGTGTA	CGTCGTGAGG	CTGCTCAGGT	CTTTCTTTTA
1741	TGTACCGGAG	ACCACGTTTC	AAAAGAACAG	GCTCTTTTTT	<u>TACCGGAAGA</u>	<u>GTGCTCTGGAG</u>
1801	<u>CAAGTTGCAA</u>	<u>AGCATTGGAA</u>	TCAGACAGCA	CTTGAAGAGG	GTGCAGCTGC	GGGAGCTGTC
1861	GGAAGCAGAG	GTCAGGCAGC	ATCGGGAAGC	CAGGCCCGCC	CTGCTGACGT	CCAGACTCCG
1921	CTTCATCCCC	AAGCCTGACG	GGCTGCGGCC	GATTGTGAAC	ATGGACTACG	<u>TCGTGGGAGC</u>
1981	<u>CAGAACGTTT</u>	CGCAGAGAAA	AGAGGGCCGA	GCGTCTCACC	TCGAGGGTGA	AGGCACTGTT
2041	CAGCGTGCTC	AACTACGAGC	GGGCGCGGCG	CCCCGGCCTC	CTGGGCGCCT	CTGTGCTGGG
2101	CCTGGACGAT	ATCCACAGGG	CCTGGCGCAC	CTTCGTGCTG	CGTGTGCGGG	CCCAGGACCC
2161	GCCGCCTGAG	CTGTACTTTG	TCAAGGTGGA	TGTGACGGGC	GCGTACGACA	CCATCCCCCA
2221	GGACAGGCTC	ACGGAGGTCA	TCGCCAGCAT	CATCAAACCC	<u>CAGAACACGT</u>	<u>ACTGCGTGCG</u>
2281	<u>TCGGTATGCC</u>	GTGGTCCAGA	AGGCCGCCCA	TGGGCACGTC	CGCAAGGCCT	TCAAGAGCCA
2341	CGTCTCTACC	TTGACAGACC	TCCAGCCGTA	CATGCGACAG	TTCTGGGCTC	ACCTGCAGGA
2401	GACCAGCCCC	CTGAGGGATG	CCGTGCTCAT	CGAGCAGAGC	TCCTCCCTGA	ATGAGGCCAG
2461	CAGTGGCCTC	TTCGACGTCT	TCCTACGCTT	CATGTGCCAC	CACGCCGTGC	GCATCAGGGG
2521	CAAGTCCTAC	GTCCAGTGCC	AGGGGATCCC	GCAGGGCTCC	ATCCTCTCCA	CGCTGCTCTG
2581	CAGCCTGTGC	TACGGCGACA	TGGAGAACAA	GCTGTTTGCG	GGGATTCCGC	GGGACGGGCT
2641	GCTCCTGCGT	TTGGTGGATG	ATTTCTTGTT	GGTGACACCT	CACCTCACCC	ACGCGAAAAC
2701	CTTCCTCAGG	ACCCTGGTCC	GAGGTGTCCC	TGAGTATGGC	TGCGTGGTGA	ACTTGCGGAA
2761	GACAGTGGTG	AACTTCCCTG	TAGAAGACGA	GGCCCTGGGT	GGCACGGCTT	TTGTTTCAGAT
2821	GCCGGCCCCC	GGCCTATTCC	CCTGGTGCGG	CCTGCTGCTG	GATACCCGGA	CCCTGGAGGT
2881	GCAAGACGAC	TACTCCAGCT	ATGCCCCGAC	CTCCATCAGA	GCCAGTCTCA	CCTTCAACCG
2941	CGGCTTCAAAG	GCTGGGAGGA	ACATGCGTCG	CAAACTCTTT	GGGGTCTTGC	GGCTGAAGTG
3001	TCACAGCCTG	TTTCTGGATT	TGCAGGTGAA	CAGCCTCCAG	ACGGTGTGCA	CCAACATCTA
3061	CAAGATCCTC	CTGCTGCAGG	CGTACAGGTT	TCACGCATGT	GTGCTGCAGC	TCCCATTTCA
3121	TCAGCAAGTT	TGGAAGAACC	CCACATTTTT	CCTGCGCGTC	ATCTCTGACA	CGGCCTCCCT
3181	CTGCTACTCC	ATCCTGAAAG	CCAAGAACGC	AGGGATGTGC	CTGGGGGCCA	AGGGCGCCGC
3241	CGGCCCTCTG	CCCTCCGAGG	CCGTGCAGTG	GCTGTGCCAC	CAAGCATTCC	TGCTCAAGCT
3301	GACTCGACAC	CGTGTCACCT	ACGTGCCACT	CCTGGGGTCA	CTCAGGACAG	CCCAGACGCA

3361 GCTGAGTCGG AAGCTCCCGG GGACGACGCT GACTGCCCTG GAGGCCGCAG CCAACCCGGC
3421 ACTGCCCTCA GACTTCAAGA CCATCCTGGA CTGATGGCCA CCCGCCACA GCCAGGCCGA
3481 GAGCAGACAC CAGCAGCCCT GTCACGCCGG GCTCTACGTC CCAGGGAGGG AGGGGCGGCC
3541 CACACCCAGG CCCGCACCGC TGGGAGTCTG AGGCCTGAGT GAGTGTGTTGG CCGAGGCCTG
3601 CATGTCCGGC TGAAGGCTGA GTGTCCGGCT GAGGCCTGAG CGAGTGTCCA GCCAAGGGCT
3661 GAGTGTCCAG CACACCTGCC GTCTTCACTT CCCCACAGGC TGGCGCTCGG CTCCACCCCA
3721 GGGCCAGCTT TTCCTCACCA GGAGCCCGGC TTCCACTCCC CACATAGGAA TAGTCCATCC
3781 CCAGATTGCG CATTGTTTAC CCCTCGCCCT GCCCTCCTTT GCCTTCCACC CCCACCATCC
3841 AGGTGGAGAC CCTGAGAAGG ACCCTGGGAG CTCTGGGAAT TTGGAGTGAC CAAAGGTGTG
3901 CCCTGTACAC AGGCGAGGAC CCTGCACCTG GATGGGGGTC CCTGTGGGTC AAATTGGGGG
3961 GAGGTGCTGT GGGAGTAAAA TACTGAATAT ATGAGTTTTT CAGTTTTGAA AAAAA

Abb. 1b



B

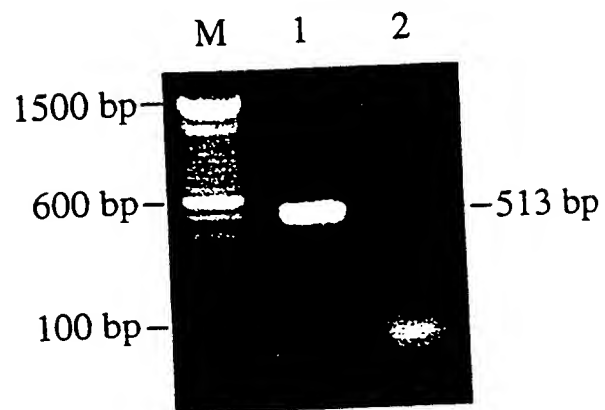


Abb. 2

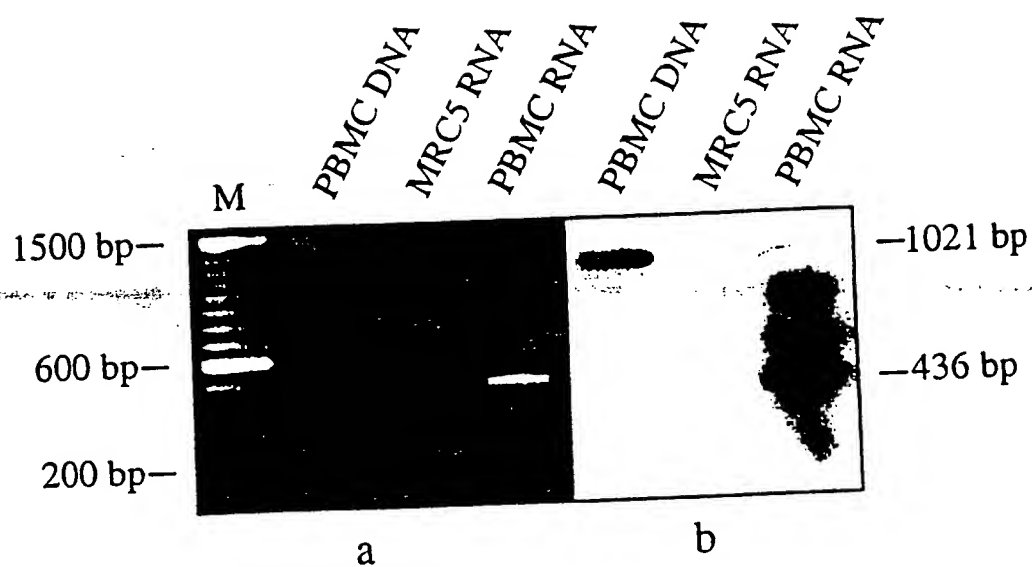


Abb. 3

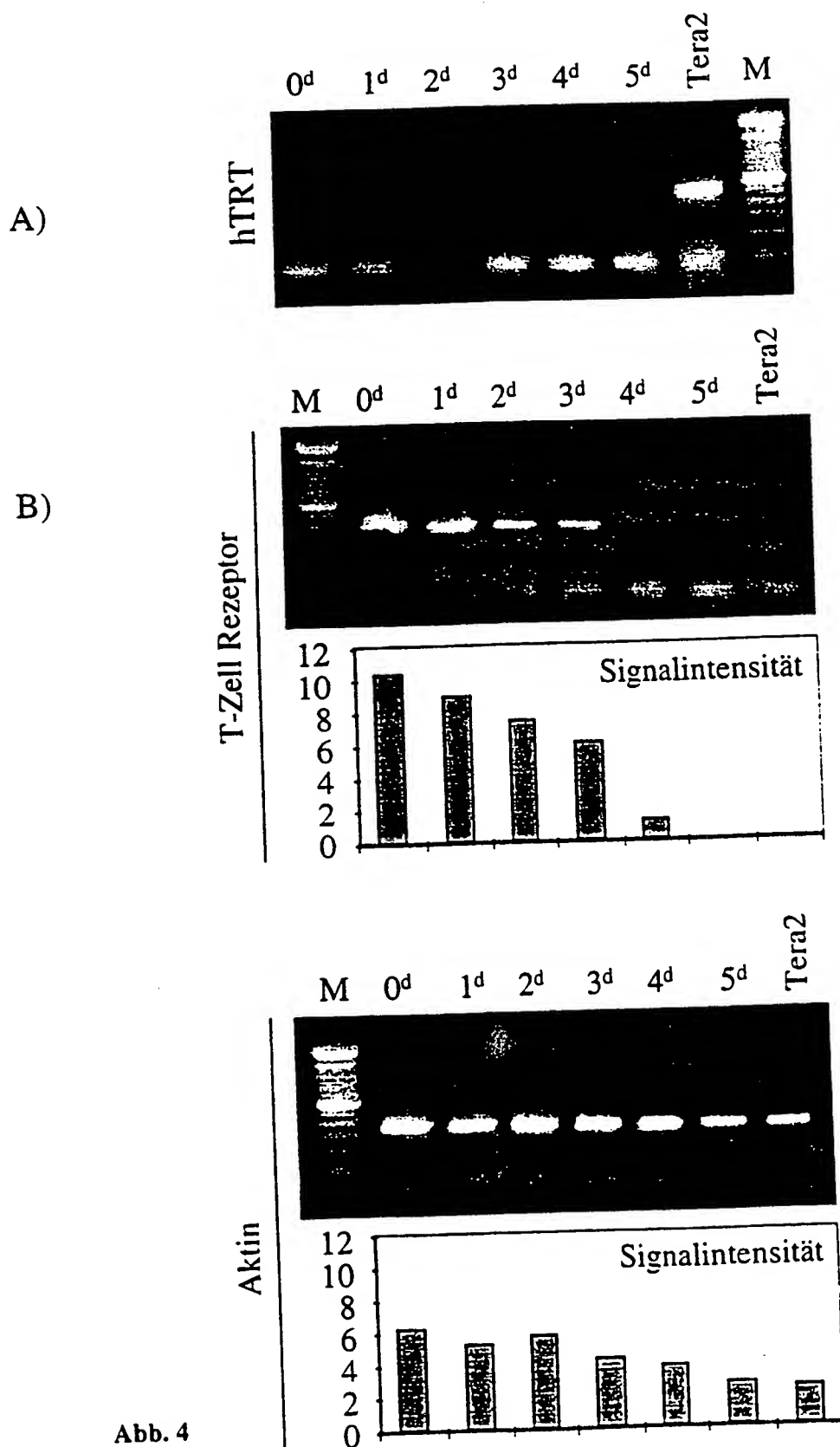


Abb. 4

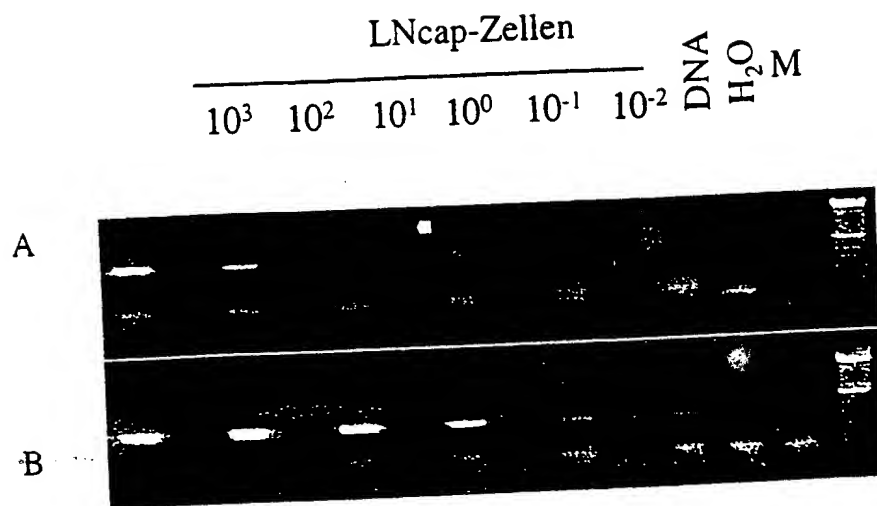


Abb. 5

Katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase:

Name	Sequenz (5'-3')
hTRT 1	CTACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGCAAAGC
hTRT 2	GGCATAACCGACGCACGCAGTACGTGTTCTG
hTRT o	CGTTCTGGCTCCCACGACGTAGTC

T-Zell-Rezeptor:

Name	Sequenz (5'-3')
TCR 1	GAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAG
TCR 2	GATCTCATAGAGGATGGTGGCAGACAG

 β -Aktin:

Name	Sequenz (5'-3')
Act 1	GATGATGATATCGCCGCGCTCGTC
Act 2	CTCAAACATGATCTGGGTCATCTTC

 β -Globin:

Name	Sequenz (5'-3')
Glob 1	ACCCAGAGGTTCTTTGAGTC
Glob 2	TCTGATAGGCAGCCTGCACT

Abb. 6

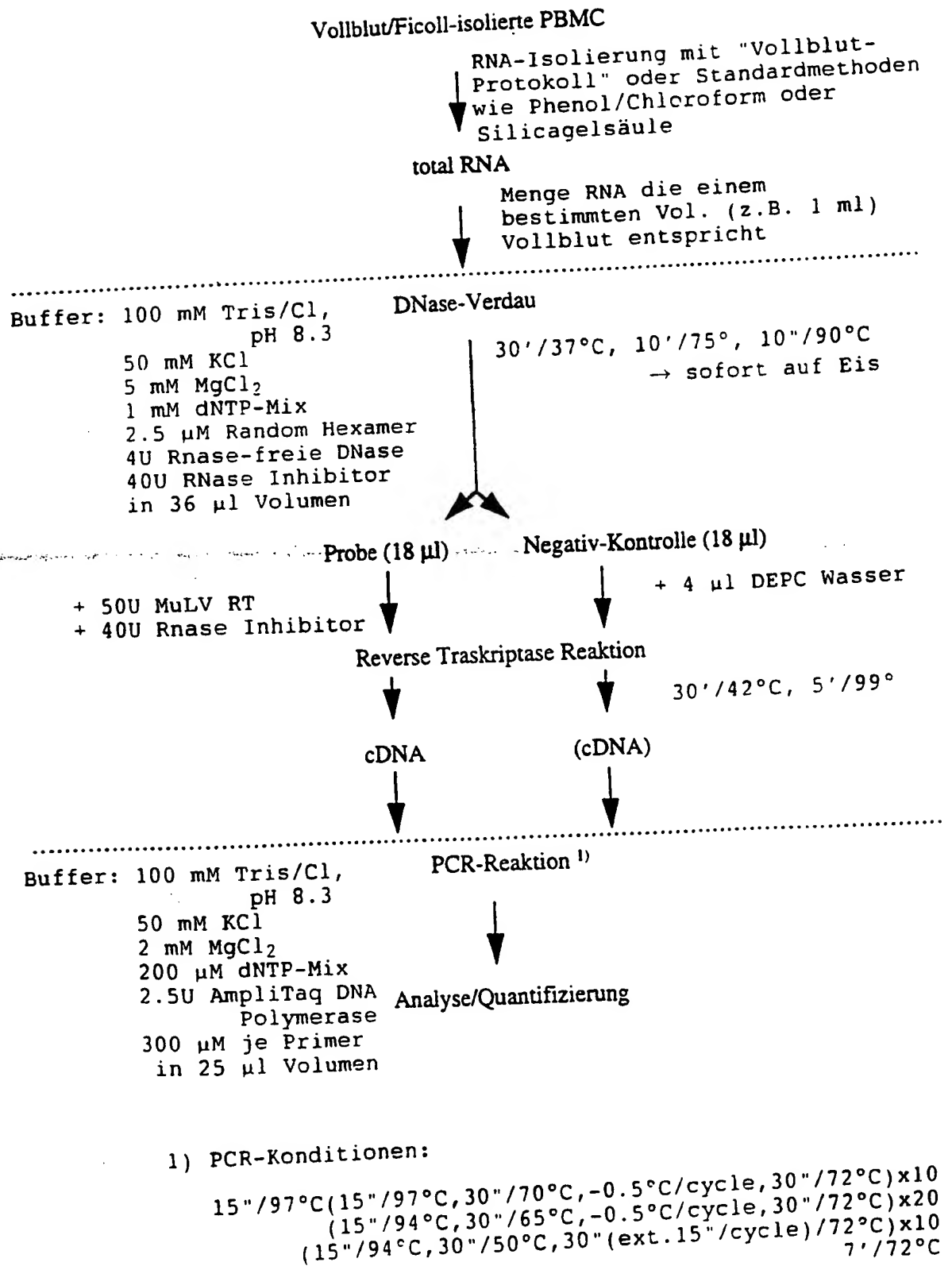
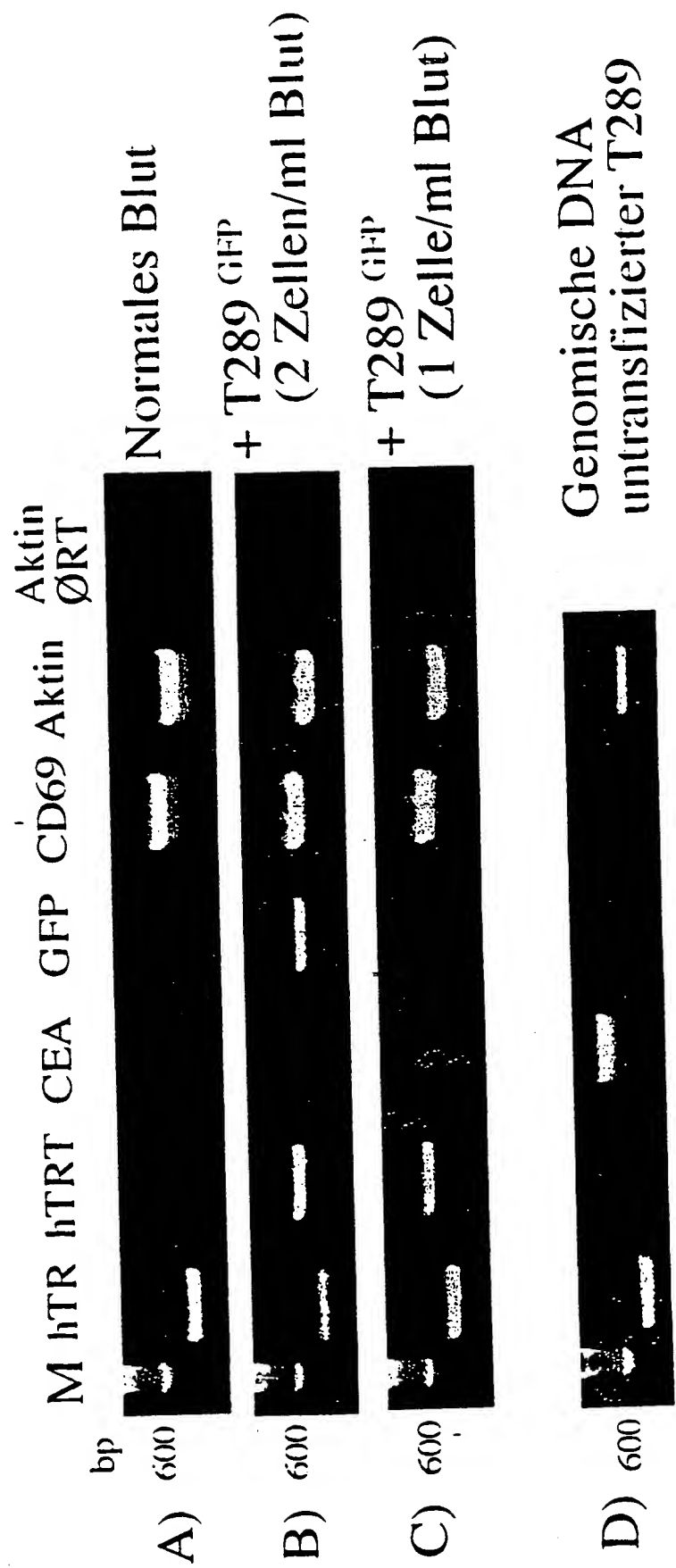
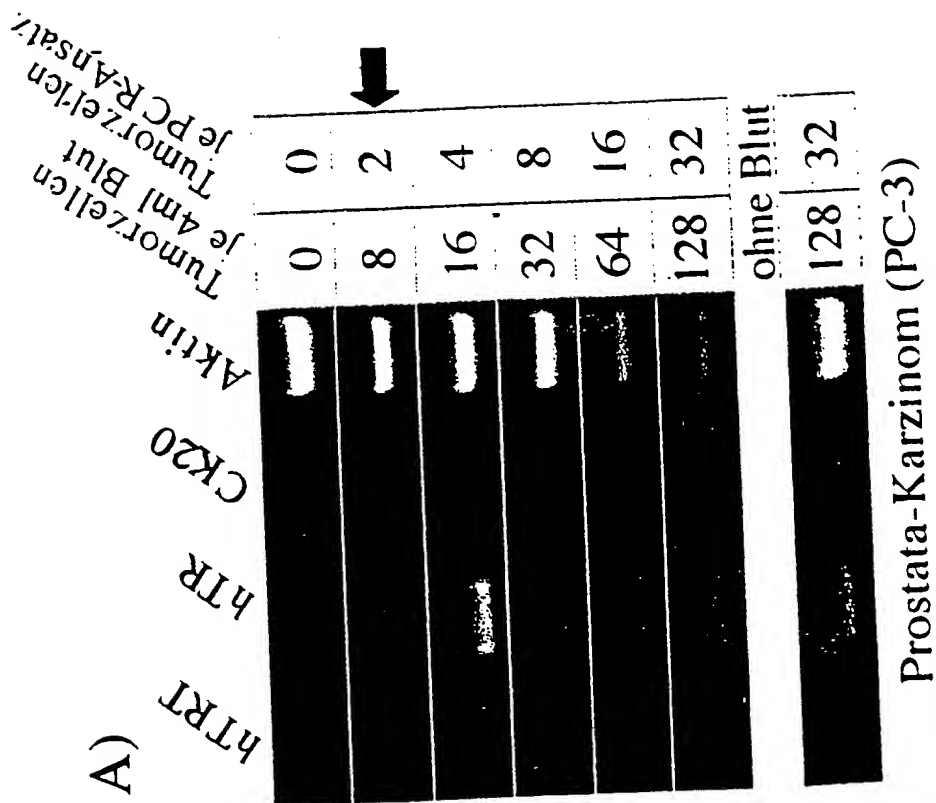
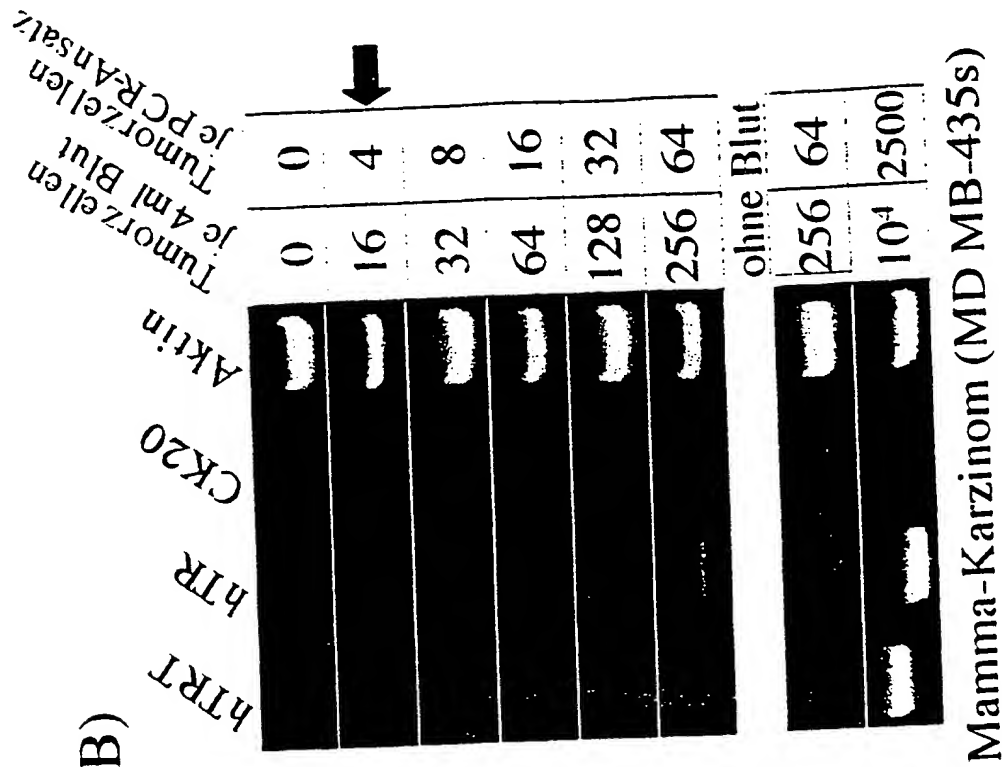


Abb. 8





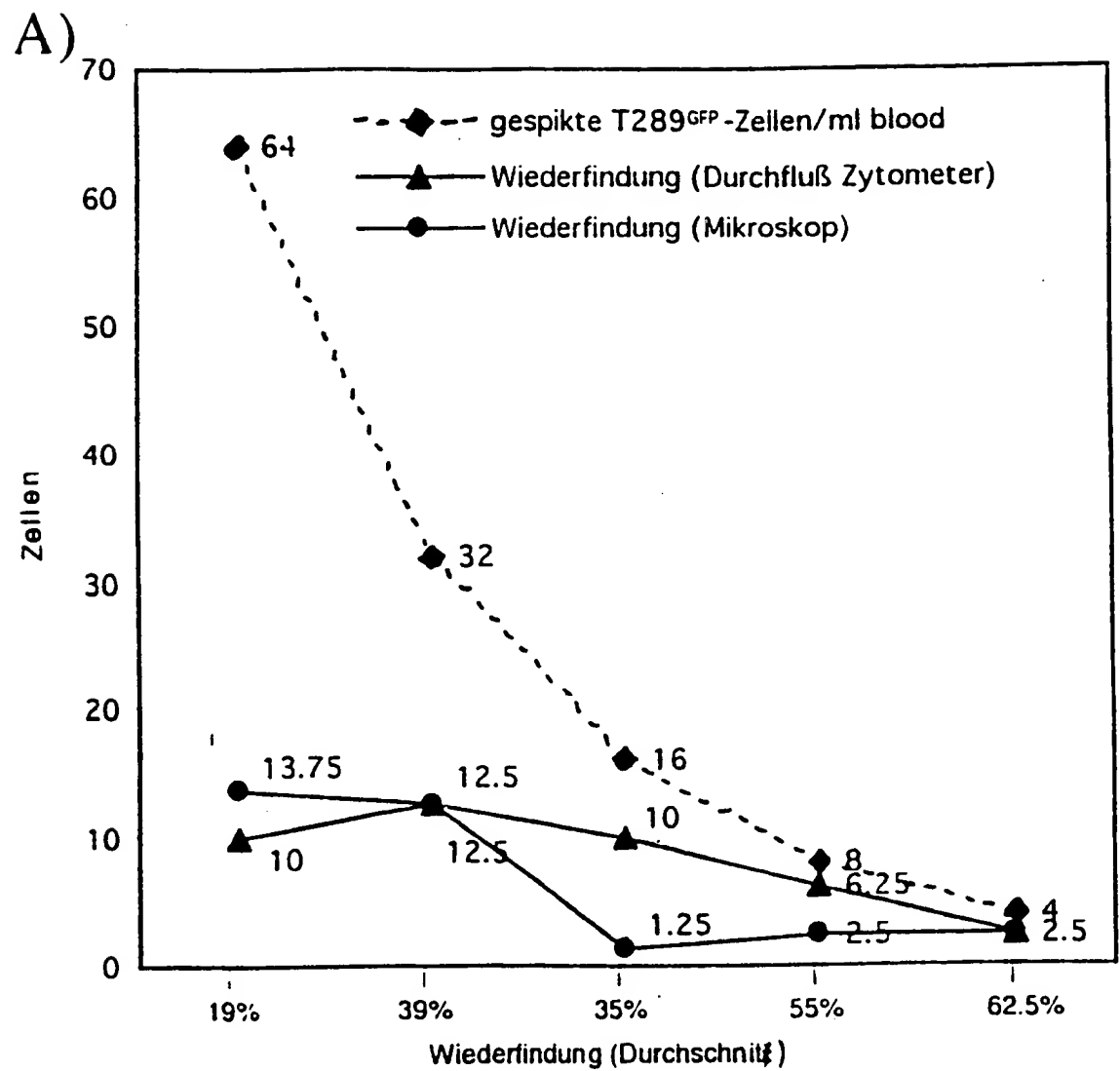


Abb. 10

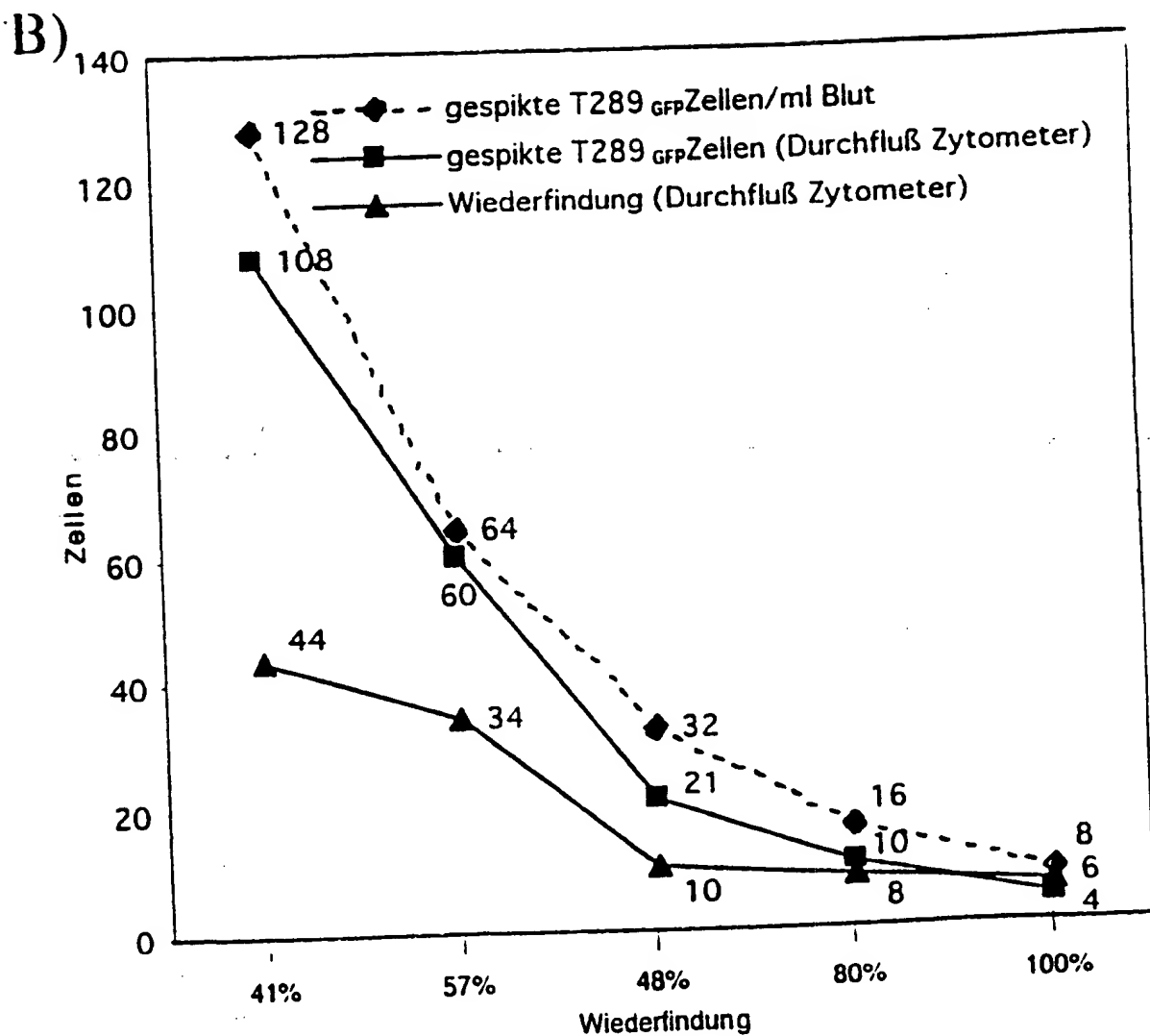


Abb. 10

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

ANMELDER:

- (A) NAME: Dr. Dr. Michael Dahm
- (B) STRASSE: Gleimstr.2
- (C) ORT: München
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 81677

ANMELDETITEL:

Verfahren zur quantitativen Bestimmung
von Tumorzellen in einer Körperflüs-
sigkeit und dazu geeignete Testkits

ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PADAT Sequenzmodul Version 1.0

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC

34

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ACCCAGAGGT TCTTTGAGTC

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TCTGATAGGC AGCCTGCACT

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GATGATGATA TCGCCGCGCT CGTC

24

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CTCAAACATG ATCTGGGTCA TCTTC

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GAGGTCGCTG TGTTTGAGCC ATCAGAAG

28

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GATCTCATAG AGGATGGTGG CAGACAG

27

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CGTTCTGGCT CCCACGACGT AGTC

24

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 4015 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCAGCGCTGC GTCCTGCTGC GCACGTGGGA AGCCCTGGCC CCGGCCACCC CCGCGATGCC 60
GCGCGCTCCC CGCTGCCGAG CCGTGCGCTC CCTGCTGCGC AGCCACTACC GCGAGGTGCT 120
GCCGCTGGCC ACGTTCGTGC GGGCCTGGG GCCCCAGGGC TGGCGGCTGG TGCAGCGCGG 180
GGACCCGGCG GCTTTCGCG CGCTGGTGGC CCAGTGCCTG GTGTGCGTGC CCTGGGACGC 240
ACGGCCGCCC CCCGCCGCC CCTCCTTCG CCAGGTGTCC TGCCTGAAGG AGCTGGTGGC 300
CCGAGTGCTG CAGAGGCTGT GCGAGCGCGG CGCAAGAAG GTGCTGGCCT TCGGCTTCGC 360
GCTGCTGGAC GGGGCCCCG GGGGCCCCC CGAGGCCTT ACCACCAGCG TGCGCAGCTA 420
CCTGCCCAAC ACGGTGACCG ACGCACTGCG GGGGAGCGGG GCGTGGGGC TGCTGCTGCG 480
CCGCGTGGGC GACGACGTGC TGGTTCACCT GCTGGCACGC TGCGCGCTCT TTGTGCTGGT 540
GGCTCCCAGC TGCGCCTACC AGGTGTGCGG GCCGCCGCTG TACCAGCTCG GCGCTGCCAC 600
TCAGGCCCCG CCCCCGCCAC ACGCTAGTGG ACCCCGAAGG CGTCTGGGAT GCGAACGGGC 660
CTGGAACCAT AGCGTCAGG AGGCCGGGGT CCCCCTGGGC CTGCCAGCCC CGGGTGCGAG 720
GAGGCGCGGG GGCAGTGCCA GCCGAAGTCT GCCGTTGCC AAGAGGCCA GGCCTGGCGC 780
TGCCCCTGAG CCGGAGCGGA CGCCCGTTGG GCAGGGGTCC TGGGCCCCACC CGGGCAGGAC 840
GCGTGGACCG AGTGACCGTG GTTCTGTGT GGTGTCACCT GCCAGACCCG CCGAAGAAGC 900
CACCTCTTTG GAGGGTGCGC TCTCTGGCAC GCGCCACTCC CACCCATCCG TGGGCCGCCA 960
GCACCACGCG GGGCCCCCAT CCACATCGCG GCCACCACGT CCCTGGGACA CGCCTTGTCC 1020
CCCGGTGTAC GCCGAGACCA AGCACTTCCT CTA CTCTCA GCGACAAGG AGCAGCTGCG 1080
GCCCTCCTTC CTA CTCTGAGGCC CAGCCTGACT GCGCTCGGA GGCTCGTGGA 1140
GACCATCTTT CTGGGTTCCA GGCCCTGGAT GCCAGGGACT CCGCGCAGGT TGCCCCGCCT 1200
GCCCCAGCGC TACTGGCAA TGCGGCCCT GTTCTGGAG CTGCTTGGGA ACCACGCGCA 1260

GTGCCCCTAC GGGGTGCTCC TCAAGACGCA CTGCCCCTG CGAGCTGCGG TCACCCCAGC 1320
AGCCCGTGTC TGTGCCCCGGG AGAAGCCCCA GGGCTCTGTG GCGGCCCCCG AGGAGGAGGA 1380
CACAGACCCC CGTCGCCTGG TGCAGCTGCT CCGCCAGCAC AGCAGCCCCCT GGCAGGTGTA 1440
CGGCTTCGTG CGGGCCTGCC TGCGCCGGCT GGTGCCCCCA GGCCTCTGGG GCTCCAGGCA 1500
CAACGAACGC CGCTTCCTCA GGAACACCAA GAAGTTCATC TCCCTGGGGA AGCATGCCAA 1560
GCTCTCGCTG CAGGAGCTGA CGTGGAAGAT GAGCGTGC GGCTGCGCTT GGCTGCGCAG 1620
GAGCCCAGGG GTTGGCTGTG TTCCGGCCGC AGAGCACCGT CTGCGTGAGG AGATCCTGGC 1680
CAAGTTCCTG CACTGGCTGA TGAGTGTGTA CGTCGTCGAG CTGCTCAGGT CTTTCTTTTA 1740
TGTCACGGAG ACCACGTTTC AAAAGAACAG GCTCTTTTTC TACCGGAAGA GTGTCTGGAG 1800
CAAGTTGCAA AGCATTGGAA TCAGACAGCA CTTGAAGAGG GTGCAGCTGC GGGAGCTGTC 1860
GGAAGCAGAG GTCAGGCAGC ATCGGGAAGC CAGGCCCCGC CTGCTGACGT CCAGACTCCG 1920
CTTCATCCCC AAGCCTGACG GGCTGCGGCC GATTGTGAAC ATGGACTACG TCGTGGGAGC 1980
CAGAACGTTC CGCAGAGAAA AGAGGGCCGA GCGTCTCACC TCGAGGGTGA AGGCACTGTT 2040
CAGCGTGCTC AACTACGAGC GGGCGCGGCG CCCC GGCCCTC CTGGGCGCCT CTGTGCTGGG 2100
CCTGGACGAT ATCCACAGGG CCTGGCGCAC CTTGCTGCTG CGTGTGCGGG CCCAGGACCC 2160
GCCGCCTGAG CTGTACTTTG TCAAGGTGGA TGTGACGGGC GCGTACGACA CCATCCCCCA 2220
GGACAGGCTC ACGGAGGTCA TCGCCAGCAT CATCAAACCC CAGAACACGT ACTGCGTGCG 2280
TCGGTATGCC GTGGTCCAGA AGGCCGCCCA TGGGCACGTC CGCAAGGCCT TCAAGAGCCA 2340
CGTCTCTACC TTGACAGACC TCCAGCCGTA CATGCGACAG TTCGTGGCTC ACCTGCAGGA 2400
GACCAGCCCC CTGAGGGATG CCGTCGTCAT CGAGCAGAGC TCCTCCCTGA ATGAGGCCAG 2460
CAGTGCCCTC TTCGACGTCT TCCTACGCTT CATGTGCCAC CACGCCGTGC GCATCAGGGG 2520
CAAGTCCTAC GTCCAGTGCC AGGGGATCCC GCAGGGCTCC ATCCTCTCCA CGCTGCTCTG 2580
CAGCCTGTGC TACGGCGACA TGGAGAACAA GCTGTTTGCG GGGATTTCGGC GGGACGGGCT 2640
GCTCCTGCGT TTGGTGGATG ATTTCTTGTT GGTGACACCT CACCTACCCC ACGCGAAAAC 2700
CTTCCTCAGG ACCCTGGTCC GAGGTGTCCC TGAGTATGGC TGCGTGGTGA ACTTGCGGAA 2760
GACAGTGGTG AACTTCCCTG TAGAAGACGA GGCCCTGGGT GGCACGGCTT TTGTTTCAGAT 2820
GCCGCCCCAC GGCCTATTCC CCTGGTGCGG CCTGCTGCTG GATACCCGGA CCCTGGAGGT 2880

GCAGAGCGAC TACTCCAGCT ATGCCCGGAC CTCCATCAGA GCCAGTCTCA CCTTCAACCG 2940
CGGCTTCAAG GCTGGGAGGA ACATGCGTCG CAAACTCTTT GGGGTCTTGC GGCTGAAGTG 3000
TCACAGCCTG TTTCTGGATT TGCAGGTGAA CAGCCTCCAG ACGGTGTGCA CCAACATCTA 3060
CAAGATCCTC CTGCTGCAGG CGTACAGGTT TCACGCATGT GTGCTGCAGC TCCCATTTC A 3120
TCAGCAAGTT TGGAAGAACC CCACATTTTT CCTGCGCGTC ATCTCTGACA CGGCCTCCCT 3180
CTGCTACTCC ATCCTGAAAG CCAAGAACGC AGGGATGTCG CTGGGGGCCA AGGGCGCCGC 3240
CGGCCCTCTG CCCTCCGAGG CCGTGCAGTG GCTGTGCCAC CAAGCATTCC TGCTCAAGCT 3300
GACTCGACAC CGTGTACCT ACGTGCCACT CCTGGGGTCA CTCAGGACAG CCCAGACGCA 3360
GCTGAGTCGG AAGCTCCCGG GGACGACGCT GACTGCCCTG GAGGCCGCAG CCAACCCGGC 3420
ACTGCCCTCA GACTTCAAGA CCATCCTGGA CTGATGGCCA CCCGCCCACA GCCAGGCCGA 3480
GAGCAGACAC CAGCAGCCCT GTCACGCCGG GCTCTACGTC CCAGGGAGGG AGGGGCGGCC 3540
CACACCCAGG CCCGCACCGC TGGGAGTCTG AGGCCTGAGT GAGTGTTTGG CCGAGGCCTG 3600
CATGTCCGGC TGAAGGCTGA GTGTCCGGCT GAGGCCTGAG CGAGTGTCCA GCCAAGGGCT 3660
GAGTGTCCAG CACACCTGCC GTCTTCACTT CCCACAGGC TGGCGCTCGG CTCCACCCCA 3720
GGGCCAGCTT TTCCTACCA GGAGCCCGGC TTCCACTCCC CACATAGGAA TAGTCCATCC 3780
CCAGATTGCG CATTGTTTAC CCCTCGCCCT GCCCTCCTTT GCCTTCCACC CCCACCATCC 3840
AGGTGGAGAC CCTGAGAAGG ACCCTGGGAG CTCTGGGAAT TTGGAGTGAC CAAAGGTGTG 3900
CCCTGTACAC AGGCGAGGAC CCTGCACCTG GATGGGGGTC CCTGTGGGTC AAATTGGGGG 3960
GAGGTGCTGT GGGAGTAAAA TACTGAATAT ATGAGTTTTT CAGTTTTGAA AAAAA 4015



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/40221</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. August 1999 (12.08.99)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 55%; vertical-align: top;"><p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00716</p><p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)</p><p>(30) Prioritätsdaten: 198 04 372.4 4. Februar 1998 (04.02.98) DE</p><p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).</p><p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).</p><p>(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).</p></td><td style="width: 45%; vertical-align: top;"><p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p><p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p><p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 14. Oktober 1999 (14.10.99)</p></td></tr></table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00716</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 04 372.4 4. Februar 1998 (04.02.98) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).</p> <p>(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 14. Oktober 1999 (14.10.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00716</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1999 (03.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 04 372.4 4. Februar 1998 (04.02.98) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C. [US/DE]; Ostpreussenweg 14, D-61118 Bad Vilbel (DE). BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Fellerer Strasse 2, D-85354 Freising (DE).</p> <p>(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 14. Oktober 1999 (14.10.99)</p>			
<p>(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY ANALYZING TUMOR CELLS IN A BODY FLUID AND TEST KITS SUITED THEREFOR</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON TUMORZELLEN IN EINER KÖRPERFLÜSSIGKEIT UND DAZU GEEIGNETE TESTKITS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for quantitatively analyzing tumor cells in a body fluid. According to the inventive method, the test sample to be examined is first subjected to a method for accumulating or depleting tumor cells, and a reaction is carried out on the accumulated or depleted tumor cells. During the reaction, the mRNA which codes for the catalytic subunit of the telomerase is specifically amplified, and afterwards, the quantity of amplified nucleic acid is quantitatively analyzed. The invention also relates to test kits suited for the invented method.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Offenbart wird ein Verfahren zur Quantifizierung von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, bei dem zuerst die zu untersuchende Probe einem Verfahren zur An- bzw. Abreicherung von Tumorzellen unterzogen wird und an den angereicherten bzw. abgereicherten Tumorzellen eine Reaktion durchgeführt wird, bei der die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodierende mRNA spezifisch amplifiziert wird, und anschließend die Menge an amplifizierter Nukleinsäure quantitativ bestimmt wird sowie dazu geeignete Testkits.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/00716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEYERSON M ET AL: "hEST2, THE PUTATIVE HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT GENE, IS UP -REGULATED IN TUMOR CELLS AND DURING IMMORTALIZATION" CELL, vol. 90, no. 4, 22 August 1997 (1997-08-22), pages 785-795, XP002056804 ISSN: 0092-8674 cited in the application the whole document --- -/--	1-51

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 1999

Date of mailing of the international search report

02/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/00716

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAMURA T M ET AL: "TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT HOMOLOGS FROM FISSION YEAST AND HUMAN" SCIENCE, vol. 277, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 955-959, XP002056803 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document ---	1-51
Y	WO 97 18322 A (DAHME MICHAEL W) 22 May 1997 (1997-05-22) cited in the application the whole document ---	1-51
Y	WO 96 01835 A (ANDREWS WILLIAM H ;VILLEPONTEAU BRYANT (US); FUNK WALTER (US); FEN) 25 January 1996 (1996-01-25) the whole document ---	1-51
A	KIM N W ET AL: "SPECIFIC ASSOCIATION OF HUMAN TELOMERASE ACTIVITY WITH IMMORTAL CELLS AND CANCER" SCIENCE, vol. 266, 23 December 1994 (1994-12-23), pages 2011-2015, XP002028668 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document ---	
A	BLASCO M A ET AL: "DIFFERENTIAL REGULATION OF TELOMERASE ACTIVITY AND TELOMERASE RNA DURING MULTI-STAGE TUMORIGENESIS" NATURE GENETICS, vol. 12, no. 2, 1 February 1996 (1996-02-01), pages 200-204, XP000673791 ISSN: 1061-4036 the whole document ---	
P,X	WO 98 37181 A (COUNTER CHRISTOPHER M ;WEINBERG ROBERT A (US); WHITEHEAD BIOMEDICA) 27 August 1998 (1998-08-27) the whole document ---	1-51
P,X	WO 98 59040 A (WICK MARESA ;BAYER AG (DE); HAGEN GUSTAV (DE); WEICHEL WALTER (DE)) 30 December 1998 (1998-12-30) see PCR Primer C5A and GSP2 the whole document ---	1-51
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/00716

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	GB 2 317 891 A (GERON CORP ;UNIV TECHNOLOGY CORP (US)) 8 April 1998 (1998-04-08) see hTRT PCR Primer the whole document ----	1-51
P,X	WO 98 14592 A (ANDREWS WILLIAM H ;CECH THOMAS R (US); MORIN GREGG B (US); NAKAMUR) 9 April 1998 (1998-04-09) the whole document -----	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00716

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9718322	A	22-05-1997	AU 1867397 A CA 2237589 A CN 1202206 A DE 19681033 D EP 0861334 A	05-06-1997 22-05-1997 16-12-1998 18-03-1999 02-09-1998
WO 9601835	A	25-01-1996	US 5583016 A US 5776679 A AU 696702 B AU 2964795 A AU 3095095 A AU 9712998 A BG 101103 A BR 9508254 A CA 2194393 A CN 1158617 A CN 1168696 A CZ 9700034 A EP 0778842 A EP 0793719 A FI 970026 A JP 10505488 T JP 10507067 T NO 970041 A NZ 289720 A PL 318169 A WO 9601614 A US 5876979 A US 5837857 A	10-12-1996 07-07-1998 17-09-1998 09-02-1996 09-02-1996 18-03-1999 31-10-1997 23-12-1997 25-01-1996 03-09-1997 24-12-1997 15-10-1997 18-06-1997 10-09-1997 03-03-1997 02-06-1998 14-07-1998 06-03-1997 29-03-1999 26-05-1997 25-01-1998 02-03-1999 17-11-1998
WO 9837181	A	27-08-1998	NONE	
WO 9859040	A	30-12-1998	AU 8214998 A	04-01-1999
GB 2317891	A	08-04-1998	AU 4803697 A AU 4807397 A CH 689672 A DE 19743497 A DE 841396 T EP 0841396 A EP 0932686 A FI 990655 A FR 2757177 A GB 2321642 A JP 10234384 A NO 991588 A WO 9814592 A WO 9814593 A	24-04-1998 24-04-1998 13-08-1999 20-08-1998 24-09-1998 13-05-1998 04-08-1999 24-03-1999 19-06-1998 05-08-1998 08-09-1998 31-05-1999 09-04-1998 09-04-1998
WO 9814592	A	09-04-1998	AU 4803697 A AU 4807397 A CH 689672 A DE 19743497 A DE 841396 T EP 0841396 A EP 0932686 A FI 990655 A FR 2757177 A	24-04-1998 24-04-1998 13-08-1999 20-08-1998 24-09-1998 13-05-1998 04-08-1999 24-03-1999 19-06-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00716

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9814592 A		GB 2317891 A,B	08-04-1998
		GB 2321642 A	05-08-1998
		JP 10234384 A	08-09-1998
		NO 991588 A	31-05-1999
		WO 9814593 A	09-04-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00716

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK:

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MEYERSON M ET AL: "hEST2, THE PUTATIVE HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT GENE, IS UP -REGULATED IN TUMOR CELLS AND DURING IMMORTALIZATION" CELL, Bd. 90, Nr. 4, 22. August 1997 (1997-08-22), Seiten 785-795, XP002056804 ISSN: 0092-8674 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-51

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. August 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/09/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	NAKAMURA T M ET AL: "TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT HOMOLOGS FROM FISSION YEAST AND HUMAN" SCIENCE, Bd. 277, 15. August 1997 (1997-08-15), Seiten 955-959, XP002056803 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-51
Y	WO 97 18322 A (DAHM MICHAEL W) 22. Mai 1997 (1997-05-22) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-51
Y	WO 96 01835 A (ANDREWS WILLIAM H ;VILLEPONTEAU BRYANT (US); FUNK WALTER (US); FEN) 25. Januar 1996 (1996-01-25) das ganze Dokument ---	1-51
A	KIM N W ET AL: "SPECIFIC ASSOCIATION OF HUMAN TELOMERASE ACTIVITY WITH IMMORTAL CELLS AND CANCER" SCIENCE, Bd. 266, 23. Dezember 1994 (1994-12-23), Seiten 2011-2015, XP002028668 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
A	BLASCO M A ET AL: "DIFFERENTIAL REGULATION OF TELOMERASE ACTIVITY AND TELOMERASE RNA DURING MULTI-STAGE TUMORIGENESIS" NATURE GENETICS, Bd. 12, Nr. 2, 1. Februar 1996 (1996-02-01), Seiten 200-204, XP000673791 ISSN: 1061-4036 das ganze Dokument ---	
P,X	WO 98 37181 A (COUNTER CHRISTOPHER M ;WEINBERG ROBERT A (US); WHITEHEAD BIOMEDICA) 27. August 1998 (1998-08-27) das ganze Dokument ---	1-51
P,X	WO 98 59040 A (WICK MARESA ;BAYER AG (DE); HAGEN GUSTAV (DE); WEICHEL WALTER (DE)) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) Siehe PCR Primer C5A and GSP2 das ganze Dokument ---	1-51

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00716

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	GB 2 317 891 A (GERON CORP ;UNIV TECHNOLOGY CORP (US)) 8. April 1998 (1998-04-08) Siehe hTRT PCR Primer das ganze Dokument ---	1-51
P,X	WO 98 14592 A (ANDREWS WILLIAM H ;CECH THOMAS R (US); MORIN GREGG B (US); NAKAMUR) 9. April 1998 (1998-04-09) das ganze Dokument -----	1-51

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00716

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9718322 A	22-05-1997	AU 1867397 A CA 2237589 A CN 1202206 A DE 19681033 D EP 0861334 A	05-06-1997 22-05-1997 16-12-1998 18-03-1999 02-09-1998
WO 9601835 A	25-01-1996	US 5583016 A US 5776679 A AU 696702 B AU 2964795 A AU 3095095 A AU 9712998 A BG 101103 A BR 9508254 A CA 2194393 A CN 1158617 A CN 1168696 A CZ 9700034 A EP 0778842 A EP 0793719 A FI 970026 A JP 10505488 T JP 10507067 T NO 970041 A NZ 289720 A PL 318169 A WO 9601614 A US 5876979 A US 5837857 A	10-12-1996 07-07-1998 17-09-1998 09-02-1996 09-02-1996 18-03-1999 31-10-1997 23-12-1997 25-01-1996 03-09-1997 24-12-1997 15-10-1997 18-06-1997 10-09-1997 03-03-1997 02-06-1998 14-07-1998 06-03-1997 29-03-1999 26-05-1997 25-01-1998 02-03-1999 17-11-1998
WO 9837181 A	27-08-1998	KEINE	
WO 9859040 A	30-12-1998	AU 8214998 A	04-01-1999
GB 2317891 A	08-04-1998	AU 4803697 A AU 4807397 A CH 689672 A DE 19743497 A DE 841396 T EP 0841396 A EP 0932686 A FI 990655 A FR 2757177 A GB 2321642 A JP 10234384 A NO 991588 A WO 9814592 A WO 9814593 A	24-04-1998 24-04-1998 13-08-1999 20-08-1998 24-09-1998 13-05-1998 04-08-1999 24-03-1999 19-06-1998 05-08-1998 08-09-1998 31-05-1999 09-04-1998 09-04-1998
WO 9814592 A	09-04-1998	AU 4803697 A AU 4807397 A CH 689672 A DE 19743497 A DE 841396 T EP 0841396 A EP 0932686 A FI 990655 A FR 2757177 A	24-04-1998 24-04-1998 13-08-1999 20-08-1998 24-09-1998 13-05-1998 04-08-1999 24-03-1999 19-06-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00716

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglieder) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9814592 A		GB 2317891 A, B	08-04-1998
		GB 2321642 A	05-08-1998
		JP 10234384 A	08-09-1998
		NO 991588 A	31-05-1999
		WO 9814593 A	09-04-1998
<hr/>			